(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)特　許　公　報（Ｂ２）　(11)特許番号
特許第5754698号
（Ｐ５７５４６９８）
(45)発行日　平成27年7月29日(2015.7.29)　(24)登録日　平成27年6月5日(2015.6.5)

(51)Int.Cl.			ＦＩ		
Ｇ０１Ｎ	33/15	(2006.01)	Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ
Ａ６１Ｋ	38/00	(2006.01)	Ａ６１Ｋ	37/02	ＺＮＡ
Ａ６１Ｐ	1/18	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	1/18	
Ａ６１Ｐ	3/00	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	3/00	
Ａ６１Ｐ	3/04	(2006.01)	Ａ６１Ｐ	3/04	

請求項の数1　（全55頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-91670(P2010-91670)
(22)出願日　平成22年4月12日(2010.4.12)
(62)分割の表示　特願2004-506842(P2004-506842)の分割
原出願日　平成15年5月30日(2003.5.30)
(65)公開番号　特開2010-229133(P2010-229133A)
(43)公開日　平成22年10月14日(2010.10.14)
審査請求日　平成22年5月12日(2010.5.12)
審判番号　不服2013-9082(P2013-9082/J1)
審判請求日　平成25年5月17日(2013.5.17)
(31)優先権主張番号　02011963.2
(32)優先日　平成14年5月29日(2002.5.29)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　02020829.4
(32)優先日　平成14年9月17日(2002.9.17)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　313010482
エボテック・インターナショナル・ゲーエムベーハー
Ｅｖｏｔｅｃ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ＧｍｂＨ
ドイツ国、デー－２２４１９　ハンブルク、エッセナー・ボーゲン　７
Ｅｓｓｅｎｅｒ　Ｂｏｇｅｎ　７，　Ｄ－２２４１９　Ｈａｍｂｕｒｇ，　Ｇｅｒｍａｎｙ
(74)代理人　100114890
弁理士　アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
(74)代理人　100099483
弁理士　久野　琢也
最終頁に続く

(54)【発明の名称】膵臓特異性タンパク質

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＲＡ７７０ポリペプチドと結合標的／薬剤との相互作用を調整する薬剤をスクリーニングする方法において、
（ａ）　下記
（ａａ）　ＲＡ７７０ポリペプチド；
（ａｂ）　前記ＲＡ７７０ポリペプチドの結合標的／薬剤、その際、該結合標的／薬剤が、膵臓細胞に関連する多成分受容体であり、該多成分受容体がＲＥＴチロシンキナーゼ及びグリコシル・ホスファチジルイノシトール・アンカードコレセプターである；および
（ａｃ）　候補薬剤
を含む混合物を、基準親和性にて前記ＲＡ７７０ポリペプチドが特異的に前記結合標的／薬剤に結合する条件下でインキュベートするステップ；
（ｂ）　（候補）薬剤偏向親和性を決定するため、前記ＲＡ７７０ポリペプチドの前記結合標的に対する結合親和性を検出するステップ；および
（ｃ）　（候補）薬剤偏向親和性と基準親和性間の差異

を確定するステップ
を含む、前記方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、膵臓組織を始めとする特定の組織に特異的に発現される核酸およびタンパク質のアミノ酸配列の使用法、および疾患および障害、例えば、限定するものではないが、糖尿病のような代謝障害を始めとする膵臓および肥満症、脂肪過多症、および／または代謝症候群のような関連障害、さらに肝臓疾患、神経変性疾患などの診断、研究、予防、および治療におけるエフェクター／修飾因子の使用法に関するものである。加えて、これらの配列はβ細胞再生に使用することができる。
【背景技術】
【０００２】
世界には １ 億 ５ 千 １００ 万人以上の糖尿病患者が存在し、その １０％ は米国、そしてその約 ２０％ は欧州に分布している （例えば、Ｚｉｍｍｅｔ らの ２０

3

０１、Ｎａｔｕｒｅ ４１４：７８２－７８７ を参照）。糖尿病は主な死亡原因であり、２１ 世紀における人間の健康に対する大きな脅威のひとつと考慮されている。糖尿病には ２ つの主な形態がある。１ 型自己免疫性糖尿病 （ＩＤＤＭ） は、膵臓ランゲルハンス島におけるインスリン産生 β 細胞の破壊に起因する。成人膵臓には、極めて限定された再生能しかないため、これらの破壊された膵島は置換されることがない。その結果、患者の生存はインスリンの外来性投与に依存することになる。小児期において １ 型糖尿病を発現する危険性は、実質的に他のすべての重症慢性病よりも大きい。２ 型糖尿病は、中度から始まり、最終的に β 細胞障害および外来性インスリン依存につながる重度のインスリン耐性および耐糖能異常まで進行することを特徴とする。高体重および座位の生活様式が２ 型糖尿病の主要な危険因子である。最近になって、ＬＡＤＡ （成人における潜在性自己免疫性糖尿病） が、１ 型および ２ 型糖尿病とは異なる糖尿病の形態として認知されている。患者が最初に ＬＡＤＡ と診断されるのは、通常 １ 型糖尿病患者よりも遅く、当初は外来性インスリンに依存せず、特に ＧＡＤ６５ に対する膵島自己抗体を有することを特徴とする。現在 ２ 型糖尿病患者と診断されている全患者の約 １０％が実際にはＬＡＤＡ 患者であると推定されている。

【０００３】

すべての妊娠中母親の約 ４％において、血糖値上昇が観察される。このタイプの糖尿病（「妊娠糖尿病」） は通常分娩後に消散するが、母親と赤ん坊との両者において、健康上の危険を呈するので治療の必要がある。

【０００４】

初期段階の ２ 型糖尿病患者はもとより、１ 型およびＬＡＤＡ 患者も、いくらかの β 細胞活性を保持していることは注目に値する。以上の点から、ほとんど乃至はすべての形態の糖尿病患者の体内に依然として存在している β 細胞を利用してインスリン分泌を改善することにより、有益な治療法を得ることができる。

【０００５】

注入可能なインスリンが利用できるようになってから、糖尿病は生命にかかわる疾病ではなくなったが、患者に深刻な負担を強要することに変わりはない。これは、インスリンなどの投与により、血糖値の高低変動を防止することができないためである。急性低血糖症は患者の昏睡および死につながり得る。頻繁な高血糖症により、糖尿病性ケトアシドーシス、末期症状の腎臓病、糖尿病性神経症、糖尿病性網膜症および切断を始めとする合併症が引き起こされる。また、糖尿病患者にとって発症の危険性が極めて高い肥満症、高血圧症、心臓病、末梢性血管障害、および感染症のような関連状態が多く存在している。これらの合併症は、糖尿病患者にかかる高額の治療費の大部分を占めており、全体的な生活の質の低下および平均寿命の低下の一因となる。

4

【０００６】

糖尿病を治癒するためには、失われた β 細胞を置換する必要がある。これは現在、膵島または膵臓移植の際に行われている。しかしながら、ドナー臓器は、大部分のインスリン依存型糖尿病性の患者に対する移植のために必要な数にも満たない不足状態である。さらに、患者は臓器移植後に起こり得る一連の異なる副作用および長期にわたる合併症に対処するため、免疫抑制療法を受けなければならない。

【０００７】

移植用材料を、患者に臓器移植前に試験管内で分化させた幹細胞から産生することが可能である。試験管内における β 細胞の分化に向かっての進歩はあるが、個別細胞の機能を高めるために、分化を促進する追加因子を同定する必要がある。

【０００８】

異なるアプローチとしては、患者体内に含有される体細胞内の幹細胞の分化によって再生する方法が挙げられる。これらの幹細胞は、膵臓内において失われた β 細胞の通常置換を仲介する幹細胞であり得る。但し、肝臓、腸などの器官のような他組織の幹細胞を適切に分化することによっても糖尿病を治療することが可能である。

【０００９】

よって、試験管内および／または生体内における β 細胞の分化および／または機能を促進できる新規因子を同定するための技術が求められている。

【００１０】

膵臓は、酵素の消化管への送達に関与する外分泌機能および種々のホルモンを血流に分泌する内分泌機能の両方を有する必須器官である。外分泌機能は、種々の消化酵素 （例えば、アミラーゼ、プロテアーゼ、核酸分解酵素など） およびアルカリ溶液中のこれらの酵素を十二指腸に輸送する介在導管を作り出す腺房細胞および房心細胞によって確保される。内分泌膵臓の機能単位はランゲルハンス島である。膵島は膵臓の外分泌部の至るところに分散しており、４ つの細胞型： α 細胞、β 細胞、δ 細胞および ＰＰ 細胞で構成されている。これは、例えば Ｋｉｍ＆Ｈｅｂｒｏｋ、２００１、Ｇｅｎｅｓ＆Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １５：１１１－１２７、および Ｓｌａｃｋ, Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １２１（１９９５）、１５６９－１５８０ でレビューされている。β 細胞は、インシュリンを産生し、内分泌細胞の大部分に相当し、ランゲルハンス島の中心を形成する一方、α 細胞はグルカゴンを分泌し、ランゲルハンス島の外周部に位置している。δ 細胞および ＰＰ 細胞は比較的に数が少なく、それぞれソマトスタチンおよび膵臓ポリペプチドを分泌する。

【００１１】

初期膵臓の発育に関しては、ニワトリ、ゼブラフィッシ

5

ュ、およびマウスを始めとする異なる種において十分に研究されている （詳細な検討に関しては、前出の Ｋｉｍ＆Ｈｅｂｒｏｃｋ、２００１ を参照）。膵臓は、固有の背側原基および腹側原基から発生する。膵臓の発生には、両方の前後軸および背側腹側軸の両方に沿った膵臓原基の特異化が必要とされる。発育中の原基内で、適切な臓器の発育にとって重要な多くの調節因子に関しての記述があるが、異なる発生プログラムの試験管内における反復は、今までのところ困難であることが分かっている。

【００１２】

中年期以降、腺房細胞および導管細胞は、膵島細胞がほとんど有糸分裂的に不活性となるのに対して、細胞の更新および成長を確保できる顕著な増殖力を維持する。胚の発育中、およびおそらく中年期以降には、膵臓ランゲルハンス島は分化する上皮 幹細胞に由来する。これらの幹細胞は発育中、膵管に位置するか、または管状の構造を形成するように見えるが、明らかではない。膵島に対する初期前駆体細胞は多型潜在性であり、初期の内分泌遺伝子発現プログラムを同時活性化する。発育が進むにつれて、膵島特異性ホルモンの発現は成熟膵島細胞の発現特性パターンに制限されるようになる。膵島の形成は動的であり、妊娠中または小児期および思春期には、インスリン要求の変化に反応する。

【００１３】

多くの膵臓疾患は、膵臓構造の欠陥または不適切な細胞再生に関連するが、これらの欠陥の根底にある分子機構は不明である。しかしながら、数々の研究によって、膵臓細胞の運命、さらに膵臓構造の形態形成、例えば、ＦＧＦ シグナル伝達、アクチビンシグナル伝達、ヘッジホッグ経路、ノッチシグナル伝達、ＶＥＧＦ シグナル伝達、およびＴＧＦ β シグナル伝達経路に影響を及ぼす多くのシグナル伝達経路が同定されている。従来の技術では、特定の膵臓組織における初期発育中に特異的に発現される候補遺伝子の同定が必要とされる。これらの遺伝子およびそれによってコードされたタンパク質は、重度の膵臓障害および関連疾患の診断および治療に対するツールを提供する。以上の点から、本発明では、発育初期の膵臓組織において特異的に発現されたタンパク質を記述する。本発明は、糖尿病のような膵臓の機能障害、および他の疾患の診断、予防および／または治療における、これらの遺伝子およびタンパク質の使用法に関するものである。

【００１４】

これまでには、糖尿病のような代謝疾患の調節機能は、本発明のタンパク質に関連する従来の技術においては記載されていない。本発明では、膵臓の発育に関与するＤＰ１１９、ＤＰ４４４、ＤＰ８１０、ＤＰ６８５、ＷＥ４７４、ＤＰ１６０、ＲＡ９７７、または ＲＡ７７０ 遺伝子およびそれらによってにコードされたタンパ

6

ク質 （本明細書中では本発明のタンパク質と呼ぶ） の新規機能を記述する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１５】

【非特許文献１】Ｚｉｍｍｅｔらの２００１、Ｎａｔｕｒｅ ４１４：７８２－７８７

【非特許文献２】Ｋｉｍ&Ｈｅｂｒｏｋ、２００１、Ｇｅｎｅｓ&Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １５：１１１－１２７

【非特許文献３】Ｓｌａｃｋ，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １２１（１９９５）、１５６９－１５８０

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１６】

胚期膵臓上皮、膵島細胞、膵臓間充織のような膵臓組、さらに前脳、菱脳、神経節、鰓弓、胃腸、腸内領域、肺臓、および間充織、および分子自体のようなその他の組織において特異的に発現された分子をコードするポリヌクレオチドの同定により、糖尿病を始めとする膵臓の疾患および障害を調査研究するための新しい可能性が提示されている。本発明のタンパク質およびこれらのタンパク質に対する抗体、同様に、当該ポリペプチドまたはタンパク質、例えばアプタマーまたはその他の受容体のエフェクター分子の同定は、膵臓の疾患、脂肪過多症および他の代謝障害、さらに神経変性疾患および他の疾患の診断、治療、および予後に有用である新規組成物を提供することによって当分野の要望に応えることができる。

【００１７】

以上の点から、ＤＰ１１９、ＤＰ４４４、ＤＰ８１０、ＤＰ６８５、ＷＥ４７４、ＤＰ１６０、ＲＡ９７７、またはＲＡ７７０ タンパク質および核酸分子コーディングは、脊椎動物種、例えば哺乳類 または鳥類から入手可能である。特に好適なのは、ヒトホモログまたはポリペプチドである （図 ２、４、６、８、１０、１２、１４、または１６ をそれぞれ参照）。また、ニワトリ核酸およびそれによってにコードされたポリペプチドも特に好適である （図 ２、４、６、８、１０、１２、１４、または１６ をそれぞれ参照）。

【課題を解決するための手段】

【００１８】

従って、本発明は、配列番号 ２、４、６、８、１０、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２ または４４のそれぞれに示したアミノ酸配列を持つ、十分に精製されたタンパク質を特徴とする。本発明の一実施態様では、本発明のタンパク質をコードする、単離され十分に精製されたポリヌクレオチドを特徴とする。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは配列番号 １、３、５、７、９、１１、１２、１３、１５、１７、１９、２１、２

7

３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１ または ４３ を有するヌクレオチド配列である。また、本発明は、配列番号 １、３、５、７、９、１１、１２、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１ または ４３、の相補体から成るポリヌクレオチド配列またはその変異体に関するものである。加えて、本発明は、ストリンジェントな条件下で、配列番号 １、３、５、７、９、１１、１２、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１ または ４３ に対してハイブリダイズするポリヌクレオチド配列および／またはその相補体を特徴とする。本発明は、加えて、上記アミノ酸配列およびポリヌクレオチドの断片またはその部分から成るポリペプチドまたはペプチド、または上記核酸配列および核酸類似体、例えばペプチド核酸 （ＰＮＡ）、モルホリノ核酸、固定核酸 （ＬＮＡ） の断片またはその部分から成るオリゴヌクレオチド、またはそのアンチセンス分子、および本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドから成る発現ベクターおよび宿主細胞を特徴とする。ポリペプチドまたはペプチド断片の長さは、望ましくは少なくとも ５、より望ましくは少なくとも ６ および最も望ましくは少なくとも ８ アミノ酸である。核酸断片および核酸類似体の長さは、望ましくは少なくとも １０、より望ましくは少なくとも １５ および最も望ましくは少なくとも ２０ ヌクレオチドである。

【００１９】

また、本発明では、本発明のタンパク質に対して 特異的に結合する抗体、および十分に精製された本発明のタンパク質から成る医薬品組成物をも特徴とする。また、本発明では、本発明のタンパク質エフェクター、例えば、アゴニストおよびアンタゴニストの使用をも特徴とする。エフェクターは、望ましくは、核酸および本発明のタンパク質の機能を調節する能力のある抗体、アプタマー、低分子量分子、アンチセンス分子、リボザイムから選択する。本発明のタンパク質をコードする核酸は、相同遺伝子または関連遺伝子の同定； コードされたタンパク質の発現または機能を調節する組成物の産生； 遺伝子治療用； タンパク質のマッピング機能領域； および関連生理学的経路の特性解明に使用する。

【００２０】

本タンパク質、ヌクレオチド配列、および方法について以下に説明するが、説明した特定の方法、プロトコル、細胞株、ベクターおよび試薬によって本発明が限定されるものではなく、改変し得ることは当然のことながら共通認識とする。また、本詳細書で使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図するものではないことも当然のことながら共通認識とする。

8

【００２１】

請求の範囲および明細書中で用いている単数形の「或る」および「その（この）」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数のものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及している。本明細書中で用いる全ての専門用語および科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有するものとする。本明細書中に記載する方法および材料に類似または等価な方法および材料は、本発明の実践または検査で用いることができるが、好適な方法、装置、および材料はここに記載する。本明細書で言及する全ての刊行物は、本発明に関連し得る刊行物中で報告されている細胞株、ベクターおよび方法論について説明および開示する目的で、ここに引用することをもって本明細書の一部となす。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

【００２２】

本発明は、ＤＰ１１９、ＤＰ４４４、ＤＰ８１０、ＤＰ６８５、ＷＥ４７４、ＤＰ１６０、ＲＡ９７７、または ＲＡ７７０ タンパク質の新規機能の発見に基づくものであり、また特にこれらのタンパク質が初期膵臓組織およびその他の組織において特異的に発現されるという知見に基づくものである。

【００２３】

本発明はさらに、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド、当該遺伝子の機能的断片、当該遺伝子またはその断片によってコードされたポリペプチド、およびエフェクター／修飾因子、例えば、アンチセンス分子、ＲＮＡｉ 分子のような抗体、生物学的に活性な核酸、またはリボザイム、アプタマー、ペプチドまたは当該ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを認識する低分子量有機化合物、およびそのような細胞に関連する、糖尿病および肥満症のような代謝疾患、神経変性疾患、心臓病、腸内疾患、肝臓障害などを始めとする疾患および障害の診断、研究、予防、または治療のためのこれらの組成物の使用法に基づくものである。

【００２４】

本発明のニワトリタンパク質をコードする核酸は、胚の膵芽において発現される遺伝子のホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ スクリーニングを介して、膵臓組織の ｃＤＮＡ ライブラリ （第 ６ 日目） から最初に同定した（実施例を参照）。

【００２５】

ゼブラフィッシュのモデル個体としての重要性は近年高

9

まっている。この種の胚は透明であり、大量に提供されており、母親の体外で急速に成長し、遺伝子機能の正逆両方の遺伝子分析を行うことができる。ゼブラフィッシュにおける膵臓の発育に関して発表されたデータは、膵島形成が極度に急速に起こること （２４ 時間以内）を示し、そしてこのプロセスには哺乳類と同一の調節遺伝子が必要であることを示唆する （Ｂｉｅｍａｒ らの Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ． ２００１ Ｆｅｂ １５；２３０（２）：１８９－２０３ を参照）。モルフォリノ アンチセンスオリゴヌクレオチド（Ｍｏｓ）、修飾ペプチド核酸 （ｍＰＮＡｓ） または優れた効率および特異性を有するその他のアンチセンス化合物を用いたゼブラフィッシュ胚における抑制遺伝子機能は、通常、同一遺伝子における遺伝的変異体と区別できない表現型を産生する （Ｎａｓｅｖｉｃｉｕｓ らの Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ． ２０００ Ｏｃｔ；２６（２）：２１６－２０； Ｅｆｆｉｍｏｖ らの ＮＡＲ ２６； ５６６－５７５； Ｕｒｔｉｓｈａｋ らの ５ｔｈ ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ ｚｅｂｒａｆｉｓｈ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｍａｄｉｓｏｎ／ＷＩ ２００２、ａｂｓｔｒ． #１７）。以上の点から、このアプローチにより、モデル脊椎動物における遺伝子機能の迅速な評価が可能となる。

【００２６】

マイクロアレイは、生体分析化学において日常的に用いられる分析ツールである。マイクロアレイは、固形担体の表面上に分布され、そして該表面に安定して関連する分子を持つ。用語「マイクロアレイ」は、基質上での複数のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、またはその他の化合物の配列構成を指す。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および／または抗体のマイクロアレイが作り出されており、遺伝子発現の監視、薬剤の発見、遺伝子シーケンシング、遺伝子マッピング、細菌の同定、およびコンビナトリアルケミストリーのような種々の用途において使用されている。マイクロアレイがとりわけ使用される一領域は、遺伝子発現分析の領域である （実施例 ４ を参照）。アレイ技術を用いて、単一の多型遺伝子または多数の関連遺伝子の発現または無関係遺伝子の発現プロファイルを研究することができる。単一遺伝子の発現を検討する場合には、アレイを用いて特異的な遺伝子またはその変異体の発現を検出する。発現プロファイルを検討する場合、アレイは、組織特異的であり、毒物試験法において検査する物質によって影響を受け、シグナル伝達カスケードの一部であり、ハウスキーピング機能を実行し、または特異的特定の遺伝的な素因、状態、疾病、または障害に関連する遺伝子を同定するためのプラットフォームを提供する。

【００２７】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析される（例えば

10

Ｂｒｅｎｎａｎ、Ｔ．Ｍ． らの （１９９５） 米国特許第 ５，４７４，７９６号 Ｓｃｈｅｎａ、Ｍ． らの （１９９６） Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ ９３：１０６１４－１０６１９： Ｂａｌｄｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒ らの（１９９５） ＰＣＴ 出願第 ＷＯ９５／２５１１１６ 号 Ｓｈａｌｏｎ、Ｄ． らの （１９９５） ＰＣＴ 出願第 ＷＯ９５／３５５０５ 号 Ｈｅｌｌｅｒ、Ｒ．Ａ． らの （１９９７） Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ ９４： ２１５０２１５５； Ｈｅｌｌｅｒ、Ｍ．Ｊ． らの （１９９７） 米国特許第 ５，６０５，６６２ 号などを参照）。各種マイクロアレイは公知であり、Ｓｃｈｅｎａ、Ｍ．、ｅｄ． （１９９９； ＤＮＡマイクロアレイ： Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｌｏｎｄｏｎ）において十分に記述されている。

【００２８】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおけるエレメントとして用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時に監視する転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。 これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多型の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行／後退を監視し、疾病治療における薬剤の活性を開発及び監視することができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロフィールを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロフィールに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【００２９】

ＤＰ１１９： 一実施例において、本発明は、図 ２Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 ２ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＤＰ１１９ タンパク質、ポリペプチドを包含する。本発明に記載の ＤＰ１１９ タンパク質を用いた ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験を、受精後 ５ 日目のニワトリ胚 （図 １Ａ）、切断された膵芽組織 （図 １Ｂ）、および ５ 日目のニワトリ胚の背側部の断面 （図 １Ｃ） のホールマウント標本上で行った。このハイブリダイゼーションにより、ＤＰ１１９ 転写物が神経節に限って、神経管 （ｎｔ） に沿って、発育中の胃腸 （ｓｔ） の外側上で、そして背側膵芽および腹側膵芽 （ｄｐｂ、ｖｐｂ） において、膵島 （ｉｓ） において、そして膵臓上皮および管細胞 （ｄｕ） の一部の細胞において、それぞれ発現されることが明らかとなる （図 １

11

を参照）。

【００３０】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＤＰ１１９ がヒト仮想タンパク質（ｃＤＮＡの Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 ＡＬ０５０１３７．１ およびタンパク質の ＣＡＢ４３２８６．１ ） と、マウス仮想タンパク質 （ｃＤＮＡ の Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 ＢＣ０２５６５４．１ およびタンパク質の ＡＡＨ２５６５４．１、図 ２ を参照） に対して相同性を持つことを見出した。相同性に基づくと、ＤＰ１１９ タンパク質および各相同性タンパク質またはペプチドは少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００３１】

ＤＰ１１９ の Ｃ末端には、オルファクトメディン様ドメインが含まれており、その Ｎ末端は、特定サイトカインに似ているシスチンに富むドメインを特徴とするこれらの ２ ドメインは、タンパク質の機能的サブドメインに相当し得る。

【００３２】

ＤＰ４４４： 一実施例では、本発明は、図 ４Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 ８ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＤＰ４４４ タンパク質、ポリペプチドを包含する。本発明に記載の ＤＰ４４４ タンパク質を用いたｉｎ－ｓｉｔｕ法実験は、受精後 ３．５ 日目 （図 ３Ａ）、４ 日目 （図 ３Ｂ）、および ５ 日目のヒヨコ 胚 （図 ３Ｃ） 上、および切断された膵芽組織 （ 図 ３Ｄ） のホールマウント上で行った。このハイブリダイゼーションにより、ＤＰ４４４ 転写物が、背側膵芽および腹側膵芽に限って、神経管に沿って、体節、発育中の腸において、背側菱脳、胃腸において、そして膵島において発現されることが明らかとなる （図 ３ を参照）。

【００３３】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば ＤＰ４４４ は、ヒトタンパク質 ＢＡＣ０３５２１、ヌクレオチド ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＡＫ０９０８１５ と相同性を持つことを見出した （詳細は実施例 １０ を参照）。また、高度に相同なマウスおよびサカナタンパク質も同定し得る （図 ４Ｋ を参照）。公共 ドメインデータベースの検索（例えば、ｈｔｔｐ：／／ｓｍａｒｔ．ｅｍｂｌ－ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ．ｄｅ／ の ＳＭＡＲＴ または ＮＣＢＩ の ＲＰＳ－ＢＬＡＳＴ） により、ＤＰ４４４ 内には既知のタンパク質ドメインが存在しないことを明らかにした。ＤＰ４４４、そのヒト、マウスおよびサカナのホモログおよびタンパク質 Ｆ２５Ｃ８．３ （ガンビエハマダラカ、ｇｉ|１９５７２３８６）、Ｆ２５Ｃ

12

８．３．ｐ （線虫 ｇｉ|１７５６０１３８） および ＣＧ１８４３７ 遺伝子産物 （キイロショウジョウバエ、ｇｉ|７３０１６１６） により、未知の機能を持つ新規ファミリーが形成される （図 ４Ｋ）。

【００３４】

ＤＰ４４４ に特異的なアンチセンス・モルフォリノ・オリゴを用いたゼブラフィッシュにおける ＤＰ４４４ 遺伝子機能のノックダウンは、すべての注入胚の ２０～３０％ の島収束欠陥につながる （図 ３Ｅ を参照）。類似の欠陥は、神経癒着分子 ＤＭ－ＧＲＡＳＰ／ｎｅｕｒｏｌｉｎ／ＢＥＮ／ＣＤ１６６ のゼブラフィッシュ ホモログが同一方法によって機能的に抑制される際に観察することができる。両遺伝子の同時抑制は相加効果につながらず、ＣＤ１６６ および ＤＰ４４４ が同一経路において作用し得ることを示唆する。ＣＤ１６６ 遺伝子は、その神経経路を先導する役割および Ｔ 細胞を活性する役割に加えて、膵臓の発育にも関与している。ＣＤ１６６ 機能と主要な膵臓調節遺伝子 Ｐｄｘ１ の発現との間の関連が示唆されている （Ｓｔｅｐｈａｎ らの Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２１２、２６４－２７７ を参照）。従って、ＤＰ４４４ は Ｐｄｘ１ 調節に関与することが可能である。

【００３５】

成人マウス組織における発現分析により、ＤＰ４４４ 転写物は脳 （特に視床下部） および膵島に制限されることが明らかとなり、β 細胞における ＤＰ４４４ の重要な機能を示唆している。

【００３６】

ＤＰ８１０： 一実施例では、本発明は、図 ６Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 １８ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＤＰ８１０様タンパク質、ポリペプチドを包含する。本発明に記載の ＤＰ８１０ タンパク質を用いた ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験は、受精後 ５ 日目の ヒヨコ 胚 （図 ５Ａ および５Ｂ）上および切断された膵芽組織 （図 ５Ｃ および ５Ｄ） のホールマウント上で行った。そのハイブリダイゼーションは、本発明の ＤＰ８１０ 転写物が膵島の外周 （ｉｓ、図 ５） およびその周辺の膵臓間充織 （ｐｍ、図 ５） に限って発現されることを示す。

【００３７】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＤＰ８１０ がヒト、おそらくマウスの多ドメインタンパク質の相同分子種 と相同性を有することを見出した （ｃＤＮＡ の ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿０２４５００．１ （図 ６Ｃ、配列番号 １９）、タンパク質の ＮＰ＿０７８７７６．１ （図 ６Ｄ、配列番号 ２０）。相同性に基づくと、ＤＰ８１０ タンパク質および各相同性タンパク質ま

13

たはペプチドは少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００３８】

多ドメインタンパク質が最初に記載されたのは ２０００ 年である （Ｇｉｌｇｅｓ Ｄ. らの ２０００、Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｊ. ３５２ Ｐｔ １：４９－５９）。タンパク質のタグ付き Ｃ末端は、Ｃｏｓ７ 細胞において発現される際に分泌されることが明らかとなった。一次配列における Ｎ グリコシル化部位および ＳＤＳ－ＰＡＧＥ ゲルのわずかに低下した運動性は、グリコシル化による翻訳後修飾を示唆する。多ドメインタンパク質の強力な発現は、ヒト胎盤および肺臓に見出され、弱い発現は脾臓、骨格筋および心臓において観察された。膵臓発現の分析は行わなかった。多ドメインタンパク質のヒトホモログは、サカナによって染色体９ｑ３２ に対してマッピングした。多ドメインタンパク質には多くのタンパク質ドメインが含まれている。最も注目に値するのは、ＥＧＦ－ （上皮成長因子）様の 反復、フォン・ヴィレブランド因子 Ａ 型ドメイン、および ３４ 相補体制御 タンパク質 （ＣＣＰ） 分子であり、細胞シグナル伝達または細胞癒着における潜在的機能を示唆している。

【００３９】

ＤＰ６８５： 一実施例では、本発明は、図 ８Ａ において示したように、配列番号 ２１ の核酸配列によってコードされたニワトリ ＤＰ６８５ タンパク質、ポリペプチドを包含する。ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験を、本発明に記載した ＤＰ６８５ タンパク質を用いて、受精後 ４ 日目 （図 ７Ａ） および ５ 日目のニワトリ胚 （図 ７Ｂ） のホールマウント上で行った。このハイブリダイゼーションにより、転写物が背側膵芽および発育中の胃腸および背側神経管、背側前脳、菱脳、鰓弓、後肢および前肢において発現されることが明らかとなる。

【００４０】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＤＰ６８５ がヒトオートタキシン－ｔ （同意語は、細胞外ヌクレオチドピロホスファターゼ／ピロホスファターゼ ２ （ＥＮＰＰ２）； Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 Ｌ４６７２０．１ および ＡＡＢ００８５５．１； 配列番号 ２３および２４） と相同性を持つ ことを見出した。相同性に基づくと、ＤＰ６８５ タンパク質および各相同性タンパク質またはペプチドは少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００４１】

二機能酵素ホスホジエステラーゼ Ｉ （ＥＣ ３．１．４．１）／ヌクレオチドピロホスファターゼ （ＥＣ ３．６．１．９） （ＰＤ－Ｉ （α） とも呼ばれる） を

14

Ｎａｒｉｔａ らの （１９９４） Ｊ. Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ. ２６９： ２８２３５－２８２４２ によりラット脳からクローニングした。ヒトＰＤ－Ｉ α 相同物は、ラットタンパク質に対して８９％ の同一性を有する ８６３ アミノ酸タンパク質である （Ｋａｗａｇｏｅ らの （１９９５） Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ３０： ３８０－３８４）。ノーザンブロット分析により、脳、胎盤、腎臓および肺臓おいて ３－ｋｂ 転写物を検出した。５２ アミノ酸が欠如しているが、さもなければ ＰＤ－Ｉ （α） と同一の明らかにスプライス変異体は、オートタキシン、腫瘍細胞の運動性刺激因子として記載されている （Ｍｕｒａｔａ らの １９９４ Ｊ. Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ. ２６９： ３０４７９－３０４８４）。前出の Ｋａｗａｇｏｅ ら（１９９５） は、種々の潜在的 ＤＮＡ 結合部位およびイントロン １ を含有した遺伝子の ５'末端に対するゲノムクローンを取得した。

【００４２】

しかしながら、最近の ２ つの刊行物では、オートタキシンがリゾホスホリパーゼ Ｄ 活性を有すること、およびそれによってリゾホスファチジン酸 （ＬＰＡ） が合成されることが同定されている （Ｔｏｋｕｍｕｒａ らの ２００２、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ. ２００２ Ａｕｇ ９； Ｕｍｅｚｕ－Ｇｏｔｏ らの ２００２、Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ. １５８（２）：２２７－３３； レビュー： Ｍｏｏｌｅｎａａｒ、２００２、Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ. １５８（２）：１９７－９）。ＬＰＡ は、細胞骨格構造、細胞増殖および細胞移動に対して影響力を持つ強力なシグナル伝達化合物である。その活性は、ｅｄｇ ファミリーに属する Ｇ タンパク質共役受容体ファミリーによって調節される。このファミリーの異なるメンバーにより、発現および下流シグナル伝達パートナーの相違が明らかされる （例えば Ｔａｋｕｗａ らの ２００２、Ｊ Ｂｉｏｃｈｅｍ （Ｔｏｋｙｏ）. １３１（６）：７６７－７１でレビューされている）。

【００４３】

本発明に示したように、ニワトリ胚の受精後 ４ 日目および ５ 日目のオートタキシンの発現パターンは、オートタキシンおよび／または オートタキシンによって合成された ＬＰＡ が動物の成長において重要だが、今のところは未知の役割を果たすことを示唆する。これは、四肢、中枢神経系および膵臓の成長、分化および形態形成の様式を考慮すると、特に著しい （図 ３ を参照）。

【００４４】

胚期膵芽におけるオートタキシンの発現は、幹細胞のような他の細胞型から取り出したインスリン分泌細胞の新規機能を示唆するものである。

【００４５】

神経組織、例えば神経管および脳、および四肢におけるオートタキシンの発現は、神経細胞および幹細胞のよう

15

な他の細胞型から取り出した運動装置の細胞の作成における、オートタキシン、ＬＰＡ、またはオートタキシンによって作成されたその他の反応産物の新規機能および使用法を示唆する

また、これは、特定の細胞型において発現されたＬＰＡ受容体に特異的なアゴニスト、またはそれらの前駆体が、これらの細胞の成長、分化、または臓器特異性構造を調節できる可能性を高める。例えば、膵臓の幹細胞、その他の幹細胞または新しいインスリン分泌細胞を作成するために使用できるその他の細胞のような特定の細胞型において多かれ少なかれ特異的に発現されるＬＰＡ受容体の刺激作用は、ＬＰＡ に関する文献において記載された多くの効果にかかわらず、比較的に特異的な応答を作り出し得る。

【００４６】

ＷＥ４７４： 一実施例では、本発明は、図 １０Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 ２８ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＷＥ４７４ タンパク質、ポリペプチドを包含する。ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験を、本発明に記載した ＷＥ４７４ タンパク質を用いて、受精後 ５ 日目のホールマウント上で行った。このハイブリダイゼーションにより、ＷＥ４７４ 転写物が発育中の膵臓を始めとして肝臓 （ｌｉ） および腸内領域 （ｉｎ） に限って発現されることが明らかとなる （図 ９Ａ）。

【００４７】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＷＥ４７４ がヒトコレクチンサブファミリーメンバー １０ と相同性を持つことを見出した （ｃＤＮＡ の Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿００６４３８．２ およびタンパク質の ＮＰ＿００６４２９．１； 配列番号 ２９ および ３０）。相同性に基づくと、ＷＥ４７４ タンパク質および各相同性タンパク質またはペプチドは少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００４８】

コレクチンは、コラーゲン様配列および炭水化物認識ドメインを有する Ｃ レクチンファミリーである。これらのタンパク質は微生物の炭水化物抗原に結合することができ、直接中和および凝集、レクチン経路を介した相補体の活性化、およびコレクチン受容体によるオプソニン作用 によって、それらの感染を抑制する （Ｏｈｔａｎｉ Ｋ． らの １９９９、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４（１９）：１３６８１－１３６８９）。肝臓 （ＣＬ－Ｌ１ （コレクチン肝臓１）） から取り出したヒトコレクチンをコードする ｃＤＮＡ は、Ｎ末端システインに富むドメイン、コラーゲン様ドメイン、ネックドメイン、および炭水化物認識ドメインから成る典型的なコレクチン構造上での特徴を持つ。このコレクチンは、その Ｃ

16

末端領域に ４ つのリシン残基独特の反復を持つ。ＣＬ－Ｌ１ は、細胞質タンパク質として主に肝臓に存在しており、また胎盤にも少量存在している。より高感受性の分析では、大部分の組織 （骨格筋を除く） には ＣＬ－Ｌ１ ｍＲＮＡ が含まれていることを明らかにした。ズーブロット分析は、ＣＬ－Ｌ１ が哺乳類および鳥類に限定されていることを示した。染色体局在性の研究は、ＣＬ－Ｌ１ 遺伝子が染色体８ｑ２３－ｑ２４．１．に局在することを示した。ＣＬ－Ｌ１ はマンノースを弱く結合する （例えば、Ｏｈｔａｎｉ Ｋ． らの １９９９、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７４（１９）：１３６８１－１３６８９ を参照）。好適なソフトウェアを用いた ＷＥ４７４ タンパク質配列の分析 （例： ＳｉｇｎａｌＰ、Ｎｉｅｌｓｅｎ らの Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ １０、１－６） により、分泌シグナルの存在が明らかとなる。従って、ＷＥ４７４ が、細胞間または自己分泌のシグナル伝達に役割を持つ可能性が高い。

【００４９】

ＤＰ１６０： 一実施例では、本発明は、図 １２Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 ３２ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＤＰ１６０ タンパク質、ポリペプチドを包含する。本発明に記載の ＤＰ１６０ タンパク質を用いた ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験を、受精後 ５ 日目のニワトリ胚 （図 １１Ａ） のホールマウント上および受精後 ５ 日目のヒヨコ 胚 （図 １１Ａ） の発育中の膵臓の断面上で行った。このハイブリダイゼーションにより、ＤＰ１６０ 転写物が神経節に限って、神経管 （ｎｔ） に沿って、発育中の胃腸（ｓｔ） の外側で、中腎において、背側膵芽および腹側膵芽 （ｄｐｂ、ｖｐｂ） において、膵島 （ｉｓ） において、そして膵臓上皮の一部の細胞において、それぞれ発現されることが明らかとなる （図 １１ を参照）。

【００５０】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＤＰ１６０ がヒトＣＣＲ４ 炭素異化代謝産物抑制 ４様タンパク質 （ＣＣＲＮ４Ｌ； Ｎｏｃｔｕｒｎｉｎ） （Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 ＸＰ＿００３３４３．３ および ＸＰ＿００３３４３．２； 配列番号 ３３ および ３４） と相同性を持つことを見出した。相同性に基づくか、または ＤＰ１６０ タンパク質および各相同性タンパク質またはペプチドは、少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００５１】

Ｎｏｃｔｕｒｎｉｎ は当初、アフリカツメガエル （Ｘｅｎｏｐｕｓ ｌａｅｖｉｓ） の光受容体において夜間に高発現する概日性クロック調節遺伝子として、ディフ

17

ァレンシャルディスプレイによって同定された。新規タンパク質をコードするが、ｎｏｃｔｕｒｎｉｎ ｃＤＮＡ は、酵母転写因子 ＣＣＲ４のC末端ドメイン、およびマウスおよびヒトＥＳＴ と強力な配列類似性を持つ。その最初の同定以来、ヒトおよびマウス由来の相同物を始めとする、ｎｏｃｔｕｒｎｉｎ／ＣＣＲ４ のさまざまな相同物がクローニングされた。Ｃ３Ｈ／Ｈｅ および Ｃ５７／Ｂｌ６ マウスにおける mRNA のノーザン法分析により、mＮｏｃ 遺伝子が、広範囲の組織において、特に肝臓、腎臓および精巣、さらには複数の脳領域において最も豊富に発現されることが明らとなった。さらに、mＮｏｃ は、mRNA の概日リズムを、ライトオフセット時をピークとして、網膜、脾臓、心臓、腎臓および肝臓において、豊富に示す （Ｗａｎｇ らの ２００１、BMC Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ １（１）：９）。

【００５２】

ＲＡ９７７： 一実施例では、本発明は、図 １４Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 ３６ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＲＡ９７７ タンパク質、ポリペプチドを包含する。ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験を、本発明に記載した ＲＡ９７７ タンパク質を用いて、受精後 ５ 日目のホールマウント上で行った。このハイブリダイゼーションにより、ＲＡ９７７ 転写物が背側膵芽に限って発現されることが明らかとなる （図 １３Ａ および １３Ｂ を参照）。

【００５３】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＲＡ９７７ がヒト上皮 膜タンパク質 ２ と相同性を持つことを見出した （ＥＭＰ２； ｃＤＮＡ の Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 ＸＭ＿０３０２１８．１ およびタンパク質の Ｐ５４８５１； 配列番号 ３７ および ３８、図 １４ を参照）。相同性に基づくと、ＲＡ９７７ タンパク質および各相同性タンパク質またはペプチドは少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００５４】

上皮 膜タンパク質 ２ （ＥＭＰ－２） は末梢性ミエリンタンパク質２２ 遺伝子ファミリーのメンバーである （ＰＭＰ２２／ＥＭＰ／ＭＰ２０ 遺伝子ファミリー）。ＰＭＰ２２ 遺伝子に影響を及ぼす突然変異は、遺伝性モーターおよび感覚神経障害と関連する。ヒトにおいては、ＥＭＰ－２ mRNA 転写物は、肝臓を始めとする大部分の組織において見出される。 ＥＭＰ－２ は、成人卵巣、心臓、肺臓および腸および胎児肺臓において最も顕著に発現される。ＰＭＰ２２ は細胞増殖およびアポトーシスの調節に関与しているので、ＥＭＰ－２ が種々の組織における類似の調節プロセスにも関与している可能性が高いようである （Ｔａｙｌｏｒ Ｖ． および Ｓｕｔｅｒ Ｕ．、１９９６、Ｇｅｎｅ １７５（１－２）：１１５－１２０）。

18

シャルコー・マリー・ツース （ＣＭＴ） 末梢神経障害は、末梢神経系に影響を及ぼす疾患の遺伝的な混成群を表す。常染色体優性 ＣＭＴ １Ｃ 型 （ＣＭＴ１Ｃ）。染色体１６ｐ１３．１－ｐ１２．３ に対して遺伝的にマッピングした。染色体１６ｐ１３．２ に対してマッピングする上皮 膜タンパク質 ２ の遺伝子（ＥＭＰ２）は、ＣＭＴ１Ｃ の候補遺伝子である （Ｓｔｒｅｅｔ Ｖ． Ａ．， ２００２， Ａｍ Ｊ Ｈｕｍ Ｇｅｎｅｔ ７０（１）：２４４－２５０）。

【００５５】

４－膜貫通タンパク質である上皮 膜タンパク質 ２ は、機能的腫瘍抑制因子表現型を介してＢ 細胞リンパ腫の発癌性を抑制し得る （Ｗａｎｇ Ｃ． Ｘ．， ２００１， Ｂｌｏｏｄ ９７（１２）：３８９０－３８９５）。

【００５６】

ＲＡ７７０： 一実施例では、本発明は、図 １６Ｂ において １ 文字コードを用いて示したように、配列番号 ４０ のアミノ酸配列から成るニワトリ ＲＡ７７０－ｌｉｋｅ タンパク質、ポリペプチドを包含する。ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション実験を、本発明に記載した ＲＡ７７０ タンパク質を用いて、受精後 ５ 日目のホールマウント上で行った （図 １５Ａ）。このハイブリダイゼーションは、本発明の ＲＡ７７０ 転写物が、十二指腸（ｄｄ） および腹側膵芽 （ｖｐｄ）、胃腸領域 （ｓｔ）、肺臓 （ｌｕ） および背側膵芽 （ｄｐｂ） に限って発現されることを示す （図 １５）。

【００５７】

予測アミノ酸配列は、公的に利用可能である ＧｅｎＢａｎｋ データベースで検索した。配列データベースを検索して、例えば、ＲＡ７７０ がヒト Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ 前駆体（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿００４５５８ （図 １６Ｃ、配列番号 ４１、図 １６Ｄ、配列番号 ４２）） およびをマウスＮｅｕｒｔｕｒｉｎ 前駆体（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿００８７３８ （図 １６Ｅ、配列番号 ４３、図 １６Ｆ、配列番号 ４４）） と相同性を有することを見出した。相同性に基づくと、ＲＡ７７０ タンパク質および各相同性タンパク質またはペプチドは少なくともある程度の活性を共有することが可能である。

【００５８】

強力な神経栄養因子である Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ （またはNRTN） を、Ｋｏｔｚｂａｕｅｒ らの（１９９６） Ｎａｔｕｒｅ ３８４： ４６７－４７０ の方法によって中国ハムスター卵巣の細胞調整培地から精製した。タンパク質は、グリア細胞株由来の神経栄養因子（ＧＤ

19

NF）に近縁である。Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ および ＧＤＮＦ は、ＴＲＮと呼ばれる固有のＴＧＦ β サブファミリ（亜科）を形成する（「ＴＧＦ β 関連ニューロトフィン」に関しては Ｔａｋａｈａｓｈｉ によるレビュー、２００１、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｖ １２（４）：３６１－７３ を参照）。このタンパク質ファミリーメンバーは、ＲＥＴ チロシンキナーゼおよびグリコシル・ホスファチジルイノシトール・アンカードコレセプター（ＧＦＲα１－４））から成る独特の多成分受容体系を介してシグナルする。これらの神経栄養因子は、末梢自律神経および感覚神経細胞、同様に、中枢運動およびドーパミン神経細胞を始めとする種々の神経細胞の生存を促進し、神経変性疾患用の治療用薬剤として期待されている。加えて、ＧＤＮＦ／ＲＥＴ シグナル伝達は、腎臓の発育および精原細胞の分化の調節においてきわめて重要である役割を果たす。ＲＥＴ 突然変異は、乳頭甲状腺ガン腫、多発性内分泌腺腫の ２Ａ 型および ２Ｂ 型、およびヒルシュスプルング病のようなさまざまなヒト疾患の原因となる。種々の機構および変異型タンパク質の生物学的特性による ＲＥＴ の活性化または不活性化を結果としてもたらしたこの突然変異は、疾病表現型と相関関係を持つように見える。ＧＤＮＦ　または変異体ＲＥＴ によって活性化されたシグナル伝達経路 は、疾病進行の分子機構および ＧＤＮＦ ファミリーリガンドの生理学的役割りを理解するために幅広く 検討されている。

【００５９】

Ｈｅｕｃｋｅｒｏｔｈ らの（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４４：１３７－１４０ には、ノックアウトマウスの ＧＤＮＦ または Ｒｅｔ における突然変異を不活性化することは、腸内神経節細胞欠損症および腎形成異常の原因となることが記載されている。また、Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ は、ＲＥＴ および ＧＰＩ 関連コレセプターを介してシグナルする。ＧＤＮＦ のように、Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ は、交感神経の、結節性の、および後根神経節の感覚神経細胞を始めとする多くの神経細胞集団の生存を促進することができる。前出の Ｈｅｕｃｋｅｒｏｔｈ ら（１９９７）は、マウスおよびヒトゲノム Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ のクローンを分離し、プレｐｒｏ Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ が ２ エキソンによってコードされることを明らかにした。マウスおよびヒトのクローンは、共通のイントロン／エキソン境界を持つ。彼らは、Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ をマウス染色体１７ に局在化するために種間戻し交配分析を使用し、Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ を １９ｐ１３．３ の合成領域に局在化するために蛍光 ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを使用した。

【００６０】

ＲＥＴ およびグリア細胞株由来の神経栄養因子突然変異がヒルシュスプルング病において報告されたことを考

20

慮して、Ｄｏｒａｙ らの（１９９８）Ｈｕｍ．Ｍｏｌｅｃ．Ｇｅｎｅｔ．７：１４４９－１４５２ では、その他のＲＥＴ リガンド、Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ を、特に ＧＤＮＦ と高い相同性を持つので、有力な候補遺伝子として見なした。前出の Ｄｏｒａｙ ら（１９９８）は、表現型が小腸にまで及ぶ重度の神経節細胞欠損症に冒された ４ 人の子供を含む大きな非血縁者間骨髄移植ファミリーにおけるヘテロ接合性ミスセンス Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ 突然変異を報告した。彼等が見出した Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ 突然変異は、ＨＳＣＲ を引き起こすには十分でなく、この多重ファミリーもまた、ＲＥＴ 突然変異を隔離したように見えた。この非依存性および相加遺伝的なイベントのカスケードは、ＨＳＣＲ に予想される遺伝の複遺伝子性パターンとよく合い、さらにリガンドの腸内神経系の発達における ＲＥＴ の役割を支える。

【００６１】

また、本発明は、本発明のタンパク質の変異体を包含する。好適な変異体は、少なくとも ８０％、およびより望ましくは ９０％ のアミノ酸配列類似性を本発明のタンパク質のアミノ酸配列に対して持つ変異体である（配列番号 ２、４、６、８、１０、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２　または ４４）。最も好適な変異体は、少なくとも ９５％ のアミノ酸配列類似性を配列番号 ２、４、６、８、１０、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２　または ４４ に対して持つ変異体である。

【００６２】

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを包含する。従って、本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードする任意の核酸配列を用いて、本発明のタンパク質を発現する組換え分子を作成することができる。特定の実施例では、本発明は、配列番号 １、３、５、７、９、１１、１２、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１ または ４３ の核酸配列から成るポリヌクレオチドを包含する。当業者にとっては当然のことながら、遺伝暗号の縮重の結果、本発明のタンパク質をコードする多数のヌクレオチド配列（一部は任意の既知の天然遺伝子のヌクレオチド配列に対して最小の相同性を有する）を産生することが可能である。従って、本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって作り得るようなありとあらゆる可能性のあるヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。

【００６３】

また、本発明に包含されるのは、種々のストリンジェントな条件下の、請求項に記載のヌクレオチド配列、および特に配列番号 １、３、５、７、９、１１、１２、１

21

３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１ または ４３ に示したヌクレオチド配列に対してハイブリダイズする能力のあるポリヌクレオチド配列、および／または その相補体である。ハイブリダイゼーション条件は、Ｗａｈｌ、Ｇ．Ｍ．および Ｓ．Ｌ．Ｂｅｒｇｅｒ（１９８７、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：３９９－４０７）およびＫｉｍｍｅｌ、Ａ．Ｒ．（１９８７、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：５０７－５１１）で教示されたように、核酸結合複合体またはプローブの溶解温度（Ｔｍ）に基づいており、定義されたストリンジェントでの使用が可能である。望ましくは、ストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションとは、1時間 １ ｘ ＳＳＣおよび0．1％ ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）を用いて５０℃にて、望ましくは５５℃にて、より望ましくは６２℃にて、および最も望ましくは６８℃にて、特に1時間 ０．２ ｘ ＳＳＣおよび0．1％ ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）中で５０℃にて、望ましくは５５℃にて、より望ましくは６２℃にて、および最も望ましくは６８℃にて洗浄後、ポジティブなハイブリダイゼーションシグナルが認められることを意味する。本発明に包含される本発明のタンパク質をコードする改造核酸配列には、異なるヌクレオチドの欠損、挿入、または置換が含まれ、機能的に同一または等価な本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを結果としてもたらす。また、コードしたタンパク質にはサイレント変化を産生するアミノ酸残基の欠損、挿入、または置換も含まれ、そして機能的に等価な本発明のタンパク質を結果としてもたらす。

【００６４】

また本発明の範囲内には、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の対立遺伝子も含むものとする。本明細書で使用されているように、「対立遺伝子」または「対立遺伝子配列」は、核酸配列において少なくとも １ つの突然変異から生じ得る遺伝子の代替形態である。対立遺伝子は、構造または機能を改変し得るかどうかわからない変性mRNAまたはポリペプチドを結果としてもたらし得る。任意の遺伝子には、ゼロ、単一、または多くの対立遺伝子形態が含まれる場合がある。対立遺伝子を誘発する一般の突然変異性変化は通常、ヌクレオチドの自然欠損、付加、または置換に帰する。これらの各変化は、単独、またはその他の変化と共に、所定の配列内で１回以上生じ得る。当分野で公知であり、一般に入手可能な DNA シーケンシングのための方法を用いて、本発明の任意の実施例を実行することが可能である。本発明のタンパク質をコードする核酸配列は、部分的ヌクレオチド配列を利用したり、当分野で周知の種々の方法を使用することによって伸長させ、プロモーターおよび調節要素等の上流配列を検出することが可能である。例えば、使用可能な方法の１つである「制限部位ＰＣＲ法」は、

22

ユニバーサルプライマーを用いて既知の遺伝子座に対して近傍する未知の配列を読み出す方法である（Ｓａｒｋａｒ、Ｇ．（１９９３）ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．２：３１８－３２２）。具体的には、ゲノム DNA を、先ず最初にプライマー存在下でリンカー配列および既知の領域に対する特異プライマーに対して増幅する。増幅した配列を、その時点で同リンカープライマーおよび最初の領域に内在する別の特異プライマーを伴なう ＰＣＲ 法の第二ラウンドの対象とする。ＰＣＲ 法の各ラウンドの産生物は、適切な ＲＮＡ ポリメラーゼで転写し、逆転写酵素を使用して配列せしめる。逆ＰＣＲ法も、既知の領域に基づいた分岐プライマーを用いて配列を増幅または伸長するために使用することが可能である（Ｔｒｉｇｌｉａ、Ｔ．らのＮｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：８１８６）。プライマーは、オリゴ ４．０６ プライマー分析ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ．，Ｐｌｙｍｏｕｔｈ、Ｍｉｎｎ．）、または別の適切なプログラムを使用して、長さが ２２～３０ ヌクレオチド、ＧＣ 含有率が ５０％ 以上、そして温度約 ６８℃～７２℃で標的配列にアニールするように設計することができる。本方法では、好適な断片を作成するためにさまざまな制限酵素を使用する。断片は、その時点で分子内の連結反応によって環状化され、ＰＣＲ 鋳型として使用する。

【００６５】

また、別の使用可能な方法としては、ヒトおよび酵母菌の人工染色体ＤＮＡにおける既知の配列に近傍するＤＮ断片のＰＣＲ増幅を伴うキャプチャＰＣＲ法があげられる（Ｌａｇｅｒｓｔｒｏｍ、Ｍ．らのＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．１：１１１～１１９）。この方法では、ＰＣＲ を行う前に複数の制限酵素の消化および連結反応をも使用して DNA 分子の未知の部分に組換え二本鎖配列を配置することができる。未知の配列を読み出すために使用可能な別の方法としては、Ｐａｒｋｅｒ、Ｊ．Ｄ．らの方法が挙げられる（１９９１；Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９：３０５５－３０６０）。加えて、ＰＣＲ 法、ネステッドプライマー、および ＰＲＯＭＯＴＥＲＦＩＮＤＥＲ ライブラリを用いて、ゲノム DNA の中に入ることができる（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、Ｃａｌｉｆ．）。このプロセスは、ライブラリをスクリーニングすることを回避し、イントロン接合部およびエキソン接合部を見つけるのに有用である。完全長ｃＤＮＡをスクリーニングする際には、より大きなｃＤＮＡを含むようにサイズ選択されたライブラリを使用することが望ましい。また、ランダム プライム ライブラリには、遺伝子の ５' 領域を含む多くの配列が含まれているので望ましい。ランダムプライムライブラリの使用は、オリゴｄ（Ｔ）ライブラリが完全長ｃＤＮＡを産しない状況にお

23

いて特に望ましい。ゲノムライブラリは、５'および３'非転写調節領域への配列の伸長に対して有用であり得る。市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シークエンシング産物または ＰＣＲ 産物のサイズを分析したり、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動分離のための流動性ポリマー、レーザー駆動の４つの異なる蛍光色素 （各ヌクレオチドあたり １ 個）、および電荷結合素子 （ＣＣＤ） カメラによる発光波長の検出を用いることが可能である。出力および光の強度は、適切なソフトウェア（例えばＰｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ社のＧＥＮＯＴＹＰＥＲおよびＳＥＱＵＥＮＣＥ ＮＡＶＩＧＡＴＯＲ）を使用して電気信号に変換することができ、試料の取り込みからコンピュータ分析までの全プロセス、および電子データ表示は、コンピュータ制御が可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないような ＤＮＡ 小片のシークエンシングに特に適している。

【００６６】

本発明の他の実施例では、本発明のタンパク質または融合タンパク質またはその機能的等価物をコードするポリヌクレオチド配列またはその機能的断片は、適切な宿主細胞内で本発明のタンパク質の発現を誘導するために、組換え ＤＮＡ 分子内で使用することが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じあるいは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別の ＤＮＡ 配列を産生することができ、これらの配列は本発明のタンパク質をクローン化および発現するために利用することが可能である。当事者にとっては当然なことだが、非天然コドンを有するタンパク質がコードするヌクレオチド配列を産生することは有益であろう。例えば、特定の真核宿主または原核宿主によって好適とされるコドンは、タンパク質の発現率を増加するため、または、例えば天然配列から作成された転写物の半減期よりも長い半減期を持つことなどの好ましい特性を有する組換えRNA転写を産生するために選択することが可能である。本発明のヌクレオチド配列は、種々の目的で本発明のタンパク質のコードする配列を変えるために、当分野で公知の方法を使用して組換えることができ、この目的には、遺伝子産物のクローン化、処理、および／または発現などが含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーションおよび ＰＣＲ 再アセンブリによる ＤＮＡ シャフリングを用い、ヌクレオチド配列を遺伝子操作することが可能である。例えば、部位特異的変異誘導を用いて、新規制限部位を挿入、グリコシル化のパターンを改変、コドン優先の変更、スプライス変異体の産生、または突然変異の導入、等々を行い得る。そのような変異型遺伝子を用いて、本発明のタンパク質の構造と機能との関係を研究すること、またはそれらの機能または

24

調節に影響を及ぼすタンパク質特性を改変することが可能である。

【００６７】

本発明の別の実施例によれば、天然の核酸配列、修飾核酸配列または本発明のタンパク質をコードする組換え核酸配列を異種配列に連結反応させ、融合タンパク質をコードすることが可能である。例えば、ペプチドライブラリを本発明のタンパク質活性のインヒビターに対してスクリーニングする際には、市販の抗体によって認識できる本発明のキメラタンパク質をコードすることは有用であろう。また、本発明のタンパク質が異種部分から切断され、離れて精製され得るようにするため、融合タンパク質が、本発明のタンパク質のコードする配列と異種タンパク質配列との間に位置する切断部位を含むように遺伝子操作することも可能である。ＤＰ４４４ タンパク質とタンパク質形質導入ペプチド間の融合タンパク質（例えば、Ｌｉｎｄｓａｙ、Ｍ. Ａ. ； Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ ２００２ Ｏｃｔ； ２（５）：５８７－９４ でレビューされている） は、組換え型の融合タンパク質を哺乳動物細胞によって取り込むことを可能にするため遺伝子操作することが可能である。他の実施例によれば、当分野で周知の化学的方法を用いて、本発明のタンパク質をコードする配列の全部または一部を合成することが可能である （Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ, Ｍ. Ｈ. らの（１９８０） Ｎｕｃｌ. Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ. Ｓｙｍｐ. Ｓｅｒ. ７：２１５－２２３, Ｈｏｒｎ, Ｔ. らの（１９８０）Ｎｕｃｌ. Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ. Ｓｙｍｐ. Ｓｅｒ. ７：２２５－２３２ を参照）。あるいは、化学的な方法を用いて本発明のタンパク質のアミノ酸配列またはその一部分を合成するためにタンパク質自体を産生することも可能である。例えば、種々の固相技術を用いてペプチド合成を行うことができ （Ｒｏｂｅｒｇｅ、Ｊ. Ｙ. らの （１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６９：２０２－２０４）、例えばＡＢＩ ４３１Ａ ペプチドシンセサイザ （Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ 社） を用いて自動合成を達成することが可能である。新規に合成されたペプチドは、分離用の高速液体クロマトグラフィーを用いて十分に精製することが可能である （Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ, Ｔ. （１９８３）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ, Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ、およびＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ, ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ., Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ, Ｎ. Ｙ. 等）。合成ペプチドの組成物は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することが可能である （例えば、Ｅｄｍａｎ ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅ； 前出のＣｒｅｉｇｈｔｏｎ）。さらに、本発明のタンパク質のアミノ酸配列またはその任意の一部は、直接合成中に変異させることができ、および／または変異型ポリペプチドを産生するために、化学的方法を使用して、別のタンパク質またはその任意の一

25

部から得た配列と結合させることが可能である。

【００６８】

生物学的に活性な本発明のタンパク質を発現するために、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列または機能的な等価物を好適な発現ベクターに挿入することができ、その発現ベクターとは、挿入されたコーディング配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクターを指す。当業者に公知の方法を用いて、本発明のタンパク質をコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、試験管内組換えＤＮＡ技術、合成技術、および生体内遺伝子組換え技術が含まれる。そのような技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｊ．らの（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、Ｎ．Ｙ．、およびＡｕｓｕｂｅｌ、Ｆ．Ｍ．らの（１９８９）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ& Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．に記載されている。

【００６９】

種々の発現ベクターと宿主系を利用して、本発明のタンパク質をコードする配列を保持および発現することが可能である。発現ベクターと宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドＤＮＡ 発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワー モザイク ウイルス ＣａＭＶ またはタバコ モザイク ウイルス ＴＭＶ）または細菌発現ベクター（例えば Ｔｉ または ｐＢＲ３２２ プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、または動物細胞系の微生物などが含まれているが、これらに限定されるものではない。

【００７０】

本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の存在は、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのプライマー、プローブ、または部分または機能的断片を用いて、ＤＮＡ－ＤＮＡ または ＤＮＡ－ＲＮＡ ハイブリダイゼーション、および／または増幅によって検出することが可能である。核酸の増幅基調アッセイには、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡまたはＲＮＡを含んだ形質転換体を検出するために、本発明のタンパク質をコードする配列に基づいたオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの使用が含まれる。本詳細書で使用した「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」とは、少なくとも約１０のヌクレオチド、そして約６０もの数のヌクレオチド、望ましくは約１５～３０ヌクレオチド、およびより望ましくは約２０～２５ヌクレオチドの核酸配列を言及し、プローブまたはアンプライマーとして使用することが可能である。

26

【００７１】

タンパク質に固有のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを用いて、本発明のタンパク質の発現を検出かつ測定するための種々のプロトコルは当分野で周知である。実施例には、酵素免疫測定（吸着）法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定（ＲＩＡ）、および蛍光細胞分析分離装置（ＦＡＣＳ）が含まれる。本発明のタンパク質上での２つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を利用する、２部位モノクローナルベースの免疫学的測定法は好適ではあるが、競合結合アッセイを用いることが可能である。

これらを含めた他のアッセイは、Ｈａｍｐｔｏｎ、Ｒ．らの（ミネソタ州セントポール市、１９９０；Ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ、Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、ＡＰＳ Ｐｒｅｓｓ）およびＭａｄｄｏｘ、Ｄ．Ｅ．らの（１９８３；Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５８：１２１１－１２１６）の諸所に記載されている。

【００７２】

本発明のタンパク質を結合する化合物、例えば抗体は、複雑型細胞の混合体から取り出した、本発明のタンパク質の発現に対して陽性反応を示す細胞の同定または濃縮に役立つ。そのような細胞集団は、これらの細胞において特異的に発現された遺伝子の同定に有用なｍＲＮＡ種を始めとして、移植用、実験評価用、および系列および細胞特異性産物のソースとして、および影響を及ぼす分子の因子を同定するための標的として有用である。

本発明のタンパク質の発現に陽性反応を示す膵臓の前駆体細胞集団は、インスリン産生β細胞； 薬物スクリーニング用； 膵島分化の実験モデルおよび他の細胞型との相互作用； 成長因子および分化因子を決定するため、加えて、膵島発育および調節に関与する遺伝子を特徴づけるための試験管内スクリーニングアッセイなどを始めとして、受容者に膵島細胞を提供するための移植において有用である。これらの目的のためには、天然細胞を使用してもよいし、改変された能力を利用するために遺伝子操作した細胞を使用してもよい。再生膵臓から取り出した細胞でも、胚期前腸、胃腸および十二指腸から取り出した細胞でも、または膵臓前駆体細胞のその他のソースから取り出した細胞でも、開始母集団として使用することが可能である。前駆体細胞は任意の哺乳動物の種、例えばウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、げっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、霊長類など、特にヒトから取得することが可能である。

【００７３】

多岐にわたる標識技術および抱合技術が当業者には周知であり、種々の核酸およびアミノ酸測定法において使用することが可能である。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、

27

標識されたハイブリダイゼーション プローブまたは ＰＣＲ プローブを生成する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いる ＰＣＲ 増幅が含まれる。

【００７４】

あるいは、本発明のタンパク質をコードする配列、またはその任意の一部分をmRNAプローブの作成のためのベクターにクローニングしてもよい。このようなベクターは、当分野において周知であり、市販もされており、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６等の好適なRNポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、試験管内でRNAプローブの合成に用いてもよい。このような手順は、市販されている種々のキット（ミシガン州カラマズーのＰｈａｒｍａｃｉａ＆Ｕｐｊｏｈｎ社、Ｐｒｏｍｅｇａ社（ウィスコンシン州マディソン）、およびU．Ｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ社（オハイオ州クリーブランド））を用いて実行することが可能である。

【００７５】

使用可能な好適レポーター分子または標識には、基質、補助因子、阻害剤、磁力粒ばかりではなく、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、または発色剤も含まれる。

【００７６】

本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列で形質転換した宿主細胞は、細胞培養からのタンパク質の発現および回収に好適な条件下で培養することが可能である。組換え細胞によって作り出されたタンパク質は、使用する配列および／またはベクターによるが、分泌または細胞内含有させることが可能である。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過する本発明のタンパク質の分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。その他の組換え構造を用いて、本発明のタンパク質をコードする配列を水溶性タンパク質の精製を促進するポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合することが可能である。そのような精製を促進するドメインには、固定化金属上での精製を可能にするヒスチジントリプトファン分子などの金属キレートペプチド、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするタンパク質 Ａ ドメイン、および ＦＬＡＧ 伸長・親和性精製システム（Ｉｍｍｕｎｅｘ Ｃｏｒｐ．，Ｓｅａｔｔｌｅ，Ｗａｓｈ．）で利用されるドメインなどが含まれるが、これらによって限定されるものではない。精製 ドメインと本発明のタンパク質との間にある ＸＡ 因子またはエンテロキナーゼ（腸活素）（カリフォルニア州のサンディエゴ市の Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ 社）に対して特異的であるような切断可能リンカー配列の包括を用いて、精製を促進することが可能である。そのような発現ベクターの １つは、チオレドキシンまたはエンテロキナーゼ（腸活素）切断部位に先行する本発明のタンパク質および６ヒスチジン残基をコードする核酸を含む融合タンパク質の発現を提供する。エンテロキナーゼ（腸活素）切断部位は、融合タンパク質から本発明のタンパク質を精製する手段を提供する一方、ヒスチジン残基は、ＩＭＩＡＣ（Ｐｏｒａｔｈ、Ｊ．らの（１９９２、Ｐｒｏｔ．Ｅｘｐ．Ｐｕｒｉｆ．３：２６３－２８１）に記載された固定化金属イオン親和性クロマトグラフィー）上での精製を促進する。融合タンパク質を含むベクターの論考は、Ｋｒｏｌｌ，Ｄ．Ｊ．らの（１９９３；ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１２：４４１－４５３）で提供されている。組換え産生に加えて本発明のタンパク質の断片は、固相技術（Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ Ｊ．（１９６３）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９－２１５４）を用いてペプチド合成を誘導することによって産生することが可能である。タンパク質合成は、手動または自動の何れの技術によっても実行することが可能である。自動合成は、例えば Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ４３１Aペプチドシンセサイザ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社）を用いて行なうことが可能である。本発明のタンパク質の種々の断片は、完全長分子を産生するために化学的方法を使用して、個別に化学的な合成および結合を行なうことが可能である。

【００７７】

本発明のタンパク質をコードする核酸を用いて、遺伝子導入動物または部位特定の遺伝子改変を細胞株において作成することができる。遺伝子導入動物は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の正常な遺伝子座が変異される場合、相同性組換えを介して作ることができる。別法として、核酸構成物をランダムにゲノムに統合することもできる。安定した統合のベクターには、プラスミド、レトロウィルスなど動物ウィルス、ＹＡＣ などが含まれる。修飾された細胞または動物は、本発明のタンパク質の機能および調節の研究において有用である。例えば、一連の小欠損および／または置換を、本発明のタンパク質をコードする遺伝子において行い、膵臓の分化などにおけるタンパク質の特定のドメイン、機能の役割を決定することが可能である。対象の特定構成物には、本発明のタンパク質の発現、または優性阻害の突然変異の発現を阻止する、アンチセンス分子が含まれる。ｌａｃ Ｚ のような検出可能なマーカーを、本発明の遺伝子の発現の上方制御が表現型における容易に検出される変化を結果としてもたらす、本発明の遺伝子の遺伝子座に導入することが可能である。また、通常には発現されない細胞や組織、または異常発生中の細胞や組織においては、本発明の遺伝子の発現またはその変異体を提供することも可能である。加えて、本発明のタンパク質の発現を、通常には産生されない細胞中に提供することによって、細胞行為の変化を誘引することが可能である。相同性組換えDNA構成物には、所望の遺伝的な修飾を有する

29

本発明の遺伝子の一部が少なくとも含まれており、標的遺伝子座に対する相同性領域も含まれる。ランダムな統合のＤＮＡ構成物には、組換えを仲介するための相同性領域が含まれる必要がない。都合よく、ポジティブ選択およびネガティブ選択用のマーカーを含む。相同性組換えを通して標的遺伝子修飾を有する細胞を作成する方法は当分野で周知である。胚幹（ＥＳ）細胞に関しては、ＥＳ細胞株を用いるか、または胚細胞を宿主、例えばマウス、ラット、モルモットなどから新たに取得することが可能である。そのような細胞は、適切は線維芽細胞－支持細胞層上で増殖するか、白血病抑制因子（ＬＩＦ）の存在下で増殖する。形質転換されたＥＳまたは胚細胞を用いて、遺伝子導入動物を産生することが可能である。形質転換後、細胞を適切な培地の支持細胞層にプレーティングする。その構成物を含んでいる細胞は、選択培地を用いることによって検出することが可能である。コロニーを十分な時間をかけて増殖した後、コロニーを摘出し、相同性組換えまたは構成物の統合の発生率を分析する。陽性反応を示すコロニーは、胚操作および胚盤胞注入に用いることが可能である。胚盤胞は、４～６週間の過排卵雌から取得する。ＥＳ細胞をトリプシン処理し、そして修飾細胞を胚盤胞の胞胚腔に注入する。注入後、胚盤胞を偽妊娠雌の各子宮角へ戻す。次に、雌に出産せしめ、結果として得られた子孫をその構成物に対してスクリーニングした。胚盤胞の異なる表現型および遺伝子操作された細胞を提供することで、キメラ子孫を容易に検出することができる。キメラ動物を修飾遺伝子の存在に対してスクリーニングし、修飾を有する雄と雌を交尾させ、ホモ接合性の子孫を産生する。その遺伝子改変が成長の過程における死亡率の原因となる場合には、組織または器官は、同種間移植用または類遺伝子性移植用、または移植、または体外培養用として維持することができる。遺伝子導入動物は、実験動物、家畜などのような任意の非ヒト哺乳動物とする。遺伝子導入動物は、機能研究、薬物スクリーニングなどにおいて使用することが可能である。

【００７８】

診断および治療

本発明のタンパク質を用いて ｉｎ－ｓｉｔｕ 発現パターンから取得した本発明に記載のタンパク質が、島細胞（例えば、ＤＰ６８５； ＤＰ１６０； ＲＡ７７０）、膵臓の間充織 （ＲＡ７７０）、膵臓上皮細胞 （例えば、ＤＰ６８５； ＤＰ１６０）、膵管細胞 （ＤＰ１６０）、同様に、神経管 （ＤＰ１６０； ＤＰ４４４）に沿った神経節、体節 （ＤＰ４４４）、背側菱脳 （ＤＰ４４４）、肝臓 （ＤＰ６８５）、心臓 （ＤＰ６８５）、胃腸 （ＤＰ４４４） および腸内細胞 （ＤＰ６８５； ＤＰ４４４） などの他の細胞のような膵臓細胞において特異的に発現されることが結論できる。以上の点から、本発明の核酸およびタンパク質およびそのエフェクター／修飾因子は、診断目的および治療目的に関与する、例えば、限定するものではないが、上記臓器または組織に関連する糖尿病および肥満症のような代謝障害および機能障害、肝臓疾患および神経疾患、例えば神経変性障害および他の疾患および障害において有用である。従って、本発明のタンパク質は、診断マーカーとして、または小分子スクリーニングの標的として、および糖尿病および／または肥満症および代謝障害および神経変性疾患、心臓、肝臓、胃腸、または腸内障害のような他の疾患の 予防 または治療において有用であり得る。

30

【００７９】

本発明の治療を目的とした用途は、例えば限定するものではないが下記が挙げられる：（ｉ） 試験管内および生体内における組織再生 （これらの組織に由来する組織および細胞型を含む全ての組織および細胞型の再生）；（ｉｉ） タンパク質治療 （ｉｉｉ） 小分子薬物標的 （ｉｖ） 抗体標的 （治療、診断、薬物ターゲッティング／細胞毒性抗体） （ｖ） 診断および／または予後 マーカー （ｖｉ） 遺伝子治療 （遺伝子配分／遺伝子除去）、および（ｖｉｉ） 研究ツール。

【００８０】

本発明の核酸およびタンパク質は、以下に記載した種々の疾患および障害および／またはその他の病理学および障害において関与するとされる治療適用例において有用である。

例えば、これらに限られるものではないが、本発明のタンパク質 をコードする ｃＤＮＡ様タンパク質は、遺伝子療法に有用であり、本発明のタンパク質のひとつは、それを必要とする被験者に投与された場合に有用である。例証として、本発明の組成物は、例えば、限定するものではないが、糖尿病および肥満症のような代謝障害およびその他の疾患および障害に苦しむ患者の治療に対して有効性を有するであろう。本発明のタンパク質をコードする新規核酸、またはその機能断片は、核酸またはそのタンパク質の存在または量が評価される診断適用例においてもさらに有用であり得る。これらの材料はさらに、治療法または診断法における使用として、本発明の新規物質に対して免疫特異的に結合する抗体の作成に有用である。本発明の他の実施例によれば、本発明の組成物、例えばタンパク質またはその機能的の断片を治療目的のために使用することが可能である。例えば、本発明に記載の膵臓特異性タンパク質のような組成物を、試験管内および／または生体内で β 細胞の分化および／または機能を促進するために使用することができる。さらに、タンパク質のような組成物、試験管内および／または生体内で、β 細胞、例えば部分的または全面的に機能障害を起こしているβ 細胞の再生のために使用することができる。

【００８１】

例えば一実施態様によれば、本発明のタンパク質に特異

31

な抗体は、アンタゴニストとして直接的に、または本発明のタンパク質を発現する細胞または組織に薬剤をもたらすターゲッティングまたは輸送機構として間接的に用いることが可能である。その抗体は当分野で周知の方法を用いて作成することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、Ｆａｂ 断片、および Ｆａｂ 発現ライブラリによって産生された断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。中和抗体 （即ち生物学的機能を抑制する抗体） は特に治療用に好適である。

【００８２】

抗体の産生に関しては、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を始めとする種々の宿主を、本発明のタンパク質、または免疫抗原性の特性を有する任意の断片またはそのオリゴペプチドを注入することによって免疫化することが可能である。宿主の種類にもよるが、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることが可能である。本発明のタンパク質に対する抗体を誘導するために用いるペプチド、断片またはオリゴペプチドは、少なくとも約５のアミノ酸からなり、より望ましくは少なくとも約１０のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが望ましい。

【００８３】

本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体は、抗体分子の産生を提供する任意の技術を使用して、培養中の連続した細胞株によって調製することが可能である。これらには、ハイブリドーマ技術、ヒトＢ 細胞ハイブリドーマ技術、および ＥＢＶ ハイブリドーマ技術 （Ｋｏｈｌｅｒ、Ｇ. らの（１９７５） Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－４９７； Ｋｏｚｂｏｒ、Ｄ. らの（１９８５）Ｊ. Ｉｍｍｕｎｏｌ. Ｍｅｔｈｏｄｓ ８１：３１－４２； Ｃｏｔｅ、Ｒ. Ｊ. らのＰｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ８０：２０２６－２０３０； Ｃｏｌｅ、Ｓ. Ｐ. らの（１９８４）Ｍｏｌ. Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ. ６２：１０９－１２０） が含まれるが、それらに限定されるものではない。加えて、「キメラ抗体」を作り出すために開発された技術には、好適な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得るためにマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子に対するスプライシングを使用することが可能である （Ｍｏｒｒｉｓｏｎ、Ｓ. Ｌ. らの（１９８４） Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ８１：６８５１－６８５５； Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ、Ｍ. Ｓ. らの（１９８４） Ｎａｔｕｒｅ ３１２：６０４－６０８； Ｔａｋｅｄａ、Ｓ. らの（１９８５） Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２－４５４）。

あるいは、一本鎖抗体を産生するために記述された技術を適用し、当分野で周知の方法を使用して、本発明のタンパク質特異性一本鎖抗体を産生することも可能である。関連特異性を有するが、固有イディオタイプ組成物の

32

一部でもある抗体は、ランダムな組み合わせの免疫グロブリンライブラリからのチェーンシャフリングによって作成することが可能である （Ｂｕｒｔｏｎ、Ｄ. Ｒ.（１９９１） Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ８８：１１１２０－３）。抗体の産生は、リンパ球集団における生体内の産生の誘導によって、または組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬パネルのスクリーニングによっても行なうことが可能である （Ｏｒｌａｎｄｉ、Ｒ. らの（１９８９） Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ８６：３８３３－３８３７、Ｗｉｎｔｅｒ、Ｇ. らの（１９９１） Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９）。

【００８４】

また、本発明のタンパク質に対する特異的な結合部位を含む抗体断片も得ることができる。例えば、そのような断片には、限定されるものではないが、抗体分子のペプシン消化によって作り出すことができるＦ（ａｂ'）２断片、およびＦ（ａｂ'）２のスルフィド架橋を還元することによって作成できるＦａｂ断片が含まれる。あるいは、Ｆａｂ 発現ライブラリを作製して、所望の特異性を有するモノクローナル Ｆａｂ 断片の迅速かつ容易な同定を可能にすることができる （Ｈｕｓｅ、Ｗ. Ｄ. らの（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５４：１２７５－１２８１）。

【００８５】

種々の免疫測定法をスクリーニングに対して用い、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。既存の特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する競合結合および免疫放射定量測定法のための幾多のプロトコルは、当分野では周知である。通常このような免疫学的測定法には、本発明のタンパク質に特異的な一本鎖抗体とその特異性抗体との間の複合体形成の計測が関与する。２つの非干渉性の本発明タンパク質エピトープに反応するモノクローナル抗体を利用する２部位モノクローナルベースの免疫測定法が望ましいが、競合結合実験を用いることもできる （前出のＭａｄｄｏｘ）。

【００８６】

本発明の別の実施例によれば、ポリヌクレオチド、またはアプタマー、アンチセンス分子、ＲＮＡｉ 分子またはリボザイムのようなその任意の断片を治療目的のために使用することが可能である。一実施態様によれば、組み合わせ核酸ライブラリの使用を含んだ手順のスクリーニングおよび選択によって、アプタマー、すなわち、本発明のタンパク質に対して結合し、その活性を調節する能力のある核酸分子を作成することが可能である。

【００８７】

さらなる実施態様によれば、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンス分子を、

mRNAの転写を阻止することが望ましいような状況において使用することが可能である。具体的には、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに補遺的な配列を利用して細胞を形質転換することが可能である。従って、アンチセンス分子を用いて本発明のタンパク質の活性の調節、または遺伝子機能の調節を達成することが可能である。現在、このような技術は当分野では周知であり、センスまたはアンチセンスのオリゴマーまたは大きな断片を、本発明のタンパク質をコードする配列のコード領域または制御領域に沿ったさまざまな位置から設計することが可能である。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスまたはワクチニアウィルス、または種々の細菌プラスミドに由来する発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団に送達することが可能である。当業者に公知の方法を用いて、本発明のタンパク質をコードする遺伝子のポリヌクレオチドに補遺的なアンチセンス分子を発現する組換えベクターを構築することが可能である。これらの技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）およびＡｕｓｕｂｅｌら（前出）の両方の文献に記載されている。本発明のタンパク質をコードする遺伝子は、ハイレベルのポリヌクレオチドを発現する発現ベクターまたは本発明のタンパク質をコードするその断片を用いて細胞または組織を形質転換することによって、オフにすることがでる。そのような構成物を用いて、翻訳不可能なセンス配列またはアンチセンス配列を細胞に導入することが可能である。ＤＮＡへの組み込みが不在の場合でさえ、そのようなベクターは、ＲＮＡ分子が内因性ヌクレアーゼ（核酸分解酵素）によって使用不可能になるまで継続してＲＮＡ分子を転写することが可能である。一過性の発現は、非複製ベクターによって１ヶ月以上持続することが可能であり、さらに適切な複製要素がそのベクター系の一部である場合には、より一層長く持続することが可能である。

【００８８】

上述したとおり、遺伝子発現の修飾は、アンチセンス分子、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはＰＮＡのような核酸アナログを、本発明のタンパク質、すなわち、プロモーター、エンハンサー、およびイントロンをコードする遺伝子の制御領域に対してデザインすることによって得ることができる。転写開始部位（例えば開始部位から－１０と＋１０の間）由来のオリゴヌクレオチドが望ましい。さらに「三重らせん」塩基対の形成方法を用いて抑制が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんＤＮＡを用いる最近の治療における進歩は文献に記載がある（Ｇｅｅ、Ｊ．Ｅ．らの（１９９４）Ｉｎ；Ｈｕｂｅｒ、Ｂ．Ｅ．ａｎｄ Ｂ．Ｉ．Ｃａｒｒ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ、Ｆｕｔｕｒａ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、Ｍｔ．Ｋｉｓｃｏ、Ｎ．Ｙ．）。また、アンチセンスは、転写物のリボソームに対する結合を防止することによって、ｍＲＮＡの翻訳を阻止する目的で設計することも可能である。

【００８９】

酵素性ＲＮＡ分子であるリボザイムは、ＲＮＡの特異的切断を触媒するために使用することが可能である。リボザイム作用のメカニズムには、内ヌクレオチド結合分解性の切断に先立つ相補的標的ＲＮＡへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションが含まれる。使用することが可能な実施例には、本発明のタンパク質をコードする配列の内ヌクレオチド結合分解性の切断を特異的且つ効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。任意の潜在的ＲＮＡ標的内の特異性リボザイム切断部位は、ＧＵＡ、ＧＵＵ、およびＧＵＣ配列を含めたリボザイム切断部位に対する標的分子を走査することによって最初に同定する。ひとたび同定すると、標的遺伝子の領域に対応し、切断部位を含む１５～２０リボヌクレオチド間の短いＲＮＡ配列は、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような二次構造的特徴に対して評価することが可能となる。また、候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護試験法（ｒｉｂｏｎｕｃｌｅａｓｅ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ａｓｓａｙ）を用いて、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性を検査することによって行うことができる。

【００９０】

エフェクター核酸分子、例えば本発明のアンチセンスおよびリボザイムは、核酸分子合成のために当分野で周知の任意の方法を用いて作ることが可能である。これらの方法には、固相フォスフォアミダイト化合合成のようなオリゴヌクレオチドを化学的に合成する技術が含まれる。あるいは、本発明のタンパク質をコードするＤＮＡ配列の生体外および生体内における転写によってＲＮＡ分子を作成することも可能である。このようなＤＮＡ配列は、Ｔ７またはＳＰ６のような好適なＲＮポリメラーゼプロモーターを用いて、種々のベクターに組み込むことができる。あるいは、アンチセンスＲＮＡを構成的または誘導的に合成するこれらｃＤＮＡ構成物は、細胞株、細胞または組織の内に導入することができる。ＲＮＡ分子を修飾して、細胞内の安定性および半減期を向上することが可能である。

可能な修飾には、分子の５'末端および／または３'末端でのフランキング配列の追加、またはホスホロチオネートの使用、または分子の背骨連鎖内のホスホジエステラーゼ連鎖ではなく２'Ｏ－メチルが含まれるが、それらに限定されるものではない。この概念は、ＰＮＡの産生に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。 それには、内在性エンドヌクレアーゼによ

35

って容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル－、メチル－、チオ－及び同様の修飾をしたもの他、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン（ｑｕｅｏｓｉｎｅ）、ワイブトシン（ｗｙｂｕｔｏｓｉｎｅ）等を加えることができる。

【００９１】

また、遺伝子機能は小さな ＲＮＡ を用いて抑制することもできる。これらは、短い （１８ ～ ２５ｂｐ） 二本鎖 ＲＮＡ （ＲＮＡ を安定性高めるために修飾してもよい）である。小さな ＲＮＡ は、合成によっても、試験管内転写手順によっても、または所望の二本鎖 ＲＮＡ を標的細胞内にヘアピン構造として発現する好適なベクターを用いても作ることができる。これらの用途には、機能的な遺伝子抑制が、組織培養中、マウスのようなモデル個体中、または治療に含まれる （例えば Ｓｈｉ、Ｙ. Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ １９（１）：９－１２； Ｓｈｕｅｙ、Ｄ. Ｊ.， Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ. ７（２０）：１０４０－６ を参照）。 また、原核細胞内のより長い （＞３０ｂｐ） アンチセンス ＲＮＡ の存在は、特定の状況下では遺伝子抑制につながり得る。

【００９２】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が提供されており、それらの方法は生体内、生体外および生体内外交通の使用に同程度に適している。生体内外交通治療では、ベクターは患者から採取した幹細胞内に導入し、同一患者に自家移植で戻すためにクローン増殖することが可能である。形質移入およびリポソーム注入による送達は、当分野で周知である方法用いて達成することが可能である。上記の治療方法はいずれも、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も望ましくはヒトなどの哺乳動物を始めとする好適な被検体に適用することが可能である。

【００９３】

本発明の追加実施例は、医薬用に許容できるキャリアと共に、上述の任意の治療効果のための医薬品組成物の投与に関するものである。そのような医薬品組成物は、本発明のタンパク質、本発明のタンパク質に対する抗体、擬態、アゴニスト（作用薬）、アンタゴニスト、または本発明のタンパク質の阻害剤から成り得る。本組成物は単独で投与することができるが、少なくとも１つの安定化化合物などの他剤と共に投与することもでき、その場合には、例えば生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロースおよび水など（これらに限定されるものではない） の滅菌した生物学的に適合な医薬品キャリアを用いて投与することが可能である。本組成物は単独で患者に投与することができるが、他剤、薬剤またはホルモンと共に投与することも可能である。本発明に用いられる医薬品組成物は、幾つもの経路によって投与することができ、その経路には経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸があるが、これらに限定されるものではない。

36

【００９４】

その活性成分に加えて、これらの医薬品組成物は、医薬用に使用することができる、活性化合物の製剤への処理を促進する、賦形剤および助剤を備えている好適な医薬用に許容できるキャリアを包含し得る。および投与に関する技術の詳細は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ （ペンシルベニア州イーストンのＭａａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ社） の最新版を参照。

【００９５】

本発明の医薬品組成物は、当分野で周知であるような方法で製造することができ、それらの手段としては、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、研和、乳化、カプセル化、取り込み、または凍結乾燥工程などがあげられる。本医薬品組成物を調製した後には、適切な容器に充填し、適応条件の治療のために標識する。本発明のタンパク質の投与に対する標識には、投与の量、頻度、および方法が明記されるであろう。

【００９６】

本発明に好適な医薬品組成物には、活性成分が所望の目的を達成するために有効な量で含有されているような成分が含まれる。有効投与量の定量は、当業者の能力の範囲内で行うものとする。任意の化合物に対する初期の治療の有効投薬量は、細胞培養アッセイ、例えば前脂肪的細胞株の細胞培養アッセイにおいて、または動物モデル、通常マウス、ウサギ、イヌまたはブタなどにおいて推定することができる。また、実験動物を好適な濃度範囲および投与経路を決定するために使用することも可能である。次にはこのような情報を用いて、ヒトに対する有益な投与量および投与経路を決定することができる。治療に有効な投与量とは、特異的な状態を治療するために十分な活性成分の量、例えば、本発明のタンパク質またはその断片、本発明のタンパク質の抗体の量のことである。治療有効度および（ｃａｎ）毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な医療品手法によって決定することができ、その例としては、ＥＤ５０（集団の５０％ の治療的有効量）およびＬＤ５０（集団の５０％ の致死量）などが挙げられる。治療効果と毒性効果間の投与量の比は、治療指数、すなわちＬＤ５０／ＥＤ５０比率として表すことができる。高い治療指数を示す医薬品組成物が望ましい。細胞培養試験法および動物実験から得たデータは、ヒト用のさまざまな投与量の製剤に使用する。そのような組成物に含まれる投与量は、毒性を殆ど持たない ＥＤ５０ を含む循環濃度の範囲内にあることが望ましい。投与量は、投与量の使用元、患者の感受性、および投与の経路によって、本範囲内で変わる。正確

な投与量は、治療を必要とする被検体に関する要因を考慮して、現場の医師が決定することになる。投与量および投与法は、十分なレベルの活性部を提供するため、または所望の効果を維持するために調節する。配慮されるべき要因には、疾患の重症度、患者の身体全体の健康状態、患者の年齢、患者の体重および性別、食習慣、投与の時間と頻度、薬剤の組み合わせ、反応感受性、および治療に対する耐性と反応が含まれる。長時間効果のある医薬品組成物は、個別製剤の半減期およびクリアランス率にもよるが、３～４日毎、１週間毎、または２週間毎に１回の間隔で投与することが可能である。通常の投与量は、投与経路にもよるが、約０．１～１００，０００マイクログラムと異なり、合計投与量は最大で約１グラムまでとする。特定の投与量および送達の方法に関する指針は文献に記載されており、通常、当分野の実務家に提供されている。当業者であれば、タンパク質または抑制剤とは異なったヌクレオチドの製剤を利用するであろう。さらにポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達も、個別の細胞、状態、位置などに対して特異的なものとなる。

【００９７】

別の実施例によれば、本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体は、本発明のタンパク質の発現を特徴とする状態または疾患の診断のため、または本発明のタンパク質、アゴニスト（作用薬）、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者を監視するための測定法において使用することが可能である。診断目的に有用な抗体は、上記の治療のために記載した方法と同様の態様で調製することが可能である。本発明のタンパク質に対する診断アッセイには、ヒトの体液または細胞または組織の抽出物において本発明のタンパク質を検出するための抗体および標識を利用する方法が含まれる。抗体は、その修飾の有無に拘わらず使用することが可能であり、その抗体を共有的または非共有的のいずれかでレポーター分子と結合することによって標識化することが可能である。当分野で周知の種々のレポーター分子を用いることが可能であり、そのさまざまなレポーター分子を上述した。

【００９８】

本発明のタンパク質を測定するためのＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、およびＦＡＣＳを始めとした種々のプロトコルは、当分野で周知であり、本発明のタンパク質発現の変化したレベルまたは異常なレベルの発現を診断するための基準 を提供する。本発明のタンパク質の発現の正常値または標準値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳動物である被検体、望ましくはヒトから採取した体液または細胞を本発明のタンパク質に対する抗体と結合させることによって樹立する。標準複合体の形成量は、種々の方法によって定量化することが可能であるが、測光的方法を用いることが望ましい。対照サンプルおよび

疾患サンプル、例えば生検組織において発現した本発明のタンパク質の量を標準値と比較する。標準値と被検体値の偏差は、疾患を診断するためのパラメータを樹立する。

【００９９】

本発明の別の実施例によれば、本発明のポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。使用可能なポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、アンチセンスＲＮＡおよび ＤＮＡ 分子、および ＰＮＡ が含まれる。ポリヌクレオチドを用いて、検体における本発明のタンパク質の発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現を検出および定量することが可能である。診断アッセイを用いて、本発明のタンパク質の不在、存在、および過剰発現を判別することが可能であり、そして治療中に本発明のタンパク質レベルの調節を監視することも可能である。

【０１００】

一実施形態によれば、本発明のタンパク質または近縁の分子をコードするゲノム配列を始めとするポリヌクレオチド配列を検出する能力を持つＰＣＲプローブを用いたハイブリダイゼーションを用いて、本発明のタンパク質をコードする核酸配列を同定することが可能である。プローブの特異性（その作成が高特異領域または低特異領域のいずれなのかによって変わる）、およびハイブリダイゼーションのストリンジェンシー、または増幅（高、中、または低）は、プローブの同定するものが本発明のタンパク質をコードする天然配列のみなのか、対立遺伝子なのか、それとも関連する配列であるのかどうかを決定する。

プローブはまた、関連する配列の検出に用いることも可能であり、配列をコードする任意の本発明のタンパク質からのヌクレオチドの少なくとも ５０％ を含んでいることが望ましい。本発明のハイブリダイゼーションプローブは、ＤＮＡ または ＲＮＡ であり得、配列認識番号 １、配列認識番号 １、３、５、７、９、１１、１２、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１ または ４３ のヌクレオチド配列、または天然の本発明のタンパク質のプロモーター、エンハンサー因子、およびイントロンを含むゲノム配列に由来し得る。本発明のタンパク質をコードするＤＮＡに対する特異的なハイブリダイゼーションプローブを産生するための手段には、本発明のタンパク質または本発明のタンパク質の誘導体をコードする核酸配列のｍＲＮＡプローブを生成するためのベクターへのクローンニングが含まれる。当分野で周知であり、かつ市販されている該ベクターを用いて、適切なＲＮポリメラーゼと適切に標識されたヌクレオチドを追加することによって、試験管内ＲＮＡプローブを合成することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーター集団によって標識することができ、その

39

例としては ３２Ｐ または ３５Ｓ 等の放射性核種、またはアビジン結合系やビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識等が挙げられる。

【０１０１】

ポリヌクレオチド配列は、条件の診断、または本発明のタンパク質の発現に関係する疾患のために使用することができる。そのような状態または疾患の実施例には、糖尿病を含む膵臓の疾患および障害が含まれるが、それらに限定されるものではない。また、ポリヌクレオチド配列を用いて、糖尿病を始めとする膵臓の疾患および障害に対する治療を受けている患者の進歩状況を監視することも可能である。ポリヌクレオチド配列は、本発明の変異タンパク質の発現を検出するために患者の生検から採取した体液または組織を利用して、サザン法、ノーザン法、ドットブロット法またはその他の膜ベースの技術、および ＰＣＲ 法、またはディップスティック法、ピンアッセイ、ＥＬＩＳＡ アッセイまたはチップアッセイにおいて使用することができる。このような定性的または定量的方法は当分野で周知である。

【０１０２】

特定の実施形態では、ヌクレオチド配列は、肥満症のほかに、上記のような関連障害もまた含む種々の代謝疾患および障害の活性化または誘発を検出する測定法において有用であり得る。ヌクレオチド配列は、標準法で標識化されることが可能であり、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液または組織の試料に添加することが可能である。好適なインキュベーション期間の後には、その試料を洗浄し、そしてそのシグナルを定量化して標準値と比較する。標準、例えば、対照試料に比較した試料において、ヌクレオチド配列の改変レベルの存在は、関連疾病の存在を示す。また、このようなアッセイを用いて、動物実験、臨床試験、または個々の患者の治療監視において、特定の治療上療法の有効性を評価することも可能である。

【０１０３】

本発明のタンパク質の発現に関連する疾患の診断基準を提供するため、発現に対する正常プロフィールまたは標準プロフィールを樹立する。これを達成するには、ハイブリダイゼーションまたは増幅に好適な条件下で、動物またはヒトの正常な被験者から抽出した体液または細胞を、本発明のタンパク質をコードする配列またはその断片と結合させることがでる。標準ハイブリダイゼーションの定量化は、正常な被検体から得た値を、既知量の十分に精製したポリヌクレオチドを使用する実験から得た値に対して比較することによって行なうことができる。正常試料から得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得た試料から得た値と比較することが可能である。標準値と被検者値間の偏差を用いて疾病の存在を確定する。一旦疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返して、患者の発現レベルが正常な患者に観察されるレベルへ近づき始めたかどうかを評価することができる。連続アッセイから得た結果を用いて、数日～数ヶ月の期間にわたる治療効果を明らかにすることができる。

40

【０１０４】

糖尿病を含む膵臓の疾患および障害に関して、個人の生検組織における比較的大きい量の転写物の存在は、疾患の発生に対する素因を示すか、または実際に臨床的症状が現れる前に疾患を検出する手段を提供することができる。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防手段または積極的な早期治療を施し、膵臓の疾病および障害の発達またはさらなる進行を防止することが可能となる。本発明のタンパク質をコードする配列からデザインされたオリゴヌクレオチドの診断上での追加用途は、ＰＣＲ法の使用に関与し得る。このオリゴマーは、化学的に合成しても良いし、酵素的に作成するか、または組換えソースから作り出しても良い。オリゴマーは望ましくは ２ つのヌクレオチド配列から構成され、１ つはセンス方向（５'．ｆｗｄａｒｗ．３'）、他の １ つアンチセンス方向（３'．ｒａｒｗ．５'）で、特定遺伝子または条件の識別のために、最適化された条件下で用いられる。また ２ つの同一のオリゴマー（ネスト化したオリゴマーのセット、または縮重オリゴマーの集積）を、あまりストリンジェントでない条件下で用い、近縁の ＤＮＡ 配列またはＲＮＡ 配列の検出あるいは（または）定量化を行なうことができる。

【０１０５】

本発明のタンパク質の定量発現を行うために使用することもできる方法には、種々の標識、例えば放射性同位元素、蛍光剤、化学発光剤、酵素、特異的な結合分子、粒子、例えば磁力 粒子などが含まれる。特異的な結合分子には、ビオチンおよびストレプトアビジン、ジゴキシンおよび抗ジゴキシンなどのようなペアが含まれる。特異的な結合メンバーに対しては、補足メンバーは通常、既知の手順に従って、検出機能を提供する分子で標識する。この方法には、調節核酸の相互増幅、および実験結果が補間された標準曲線等が含まれる （Ｍｅｌｂｙ，Ｐ．Ｃ．らの （１９９３） Ｊ． Ｉｍｍｕｎｏｌ． Ｍｅｔｈｏｄｓ， １５９：２３５－２４４； Ｄｕｐｌａａ， Ｃ．らの （１９９３） Ａｎａｌ． Ｂｉｏｃｈｅｍ． ２１２：２２９－２３６）。複数サンプルの定量速度を加速するには、目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、そして分光光度法または非色応答が迅速な定量に関与するような状態にある、ＥＬＳＡ 形態のアッセイを実行することができる。

【０１０６】

本発明の別の実施例によれば、本発明のタンパク質をコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有効なハイブリダイゼーションプローブを

41

作成することも可能である。その配列は、特定の染色体にマッピングするか、または周知の方法を用いて染色体の特異的な領域にマッピングすることが可能である。このような技術には、ＦＩＳＨ、ＦＡＣＳ、または酵母人工染色体、細菌人工染色体、細菌 Ｐ１ 構築または単一染色体ｃＤＮＡ ライブラリのような人工染色構造があり、Ｐｒｉｃｅ、Ｃ．Ｍ．（１９９３）Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ．７：１２７－１３４、およびＴｒａｓｋ、Ｂ．Ｊ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．７：１４９－１５４．ＦＩＳＨ（Ｖｅｒｍａ らによって記述されているとおり（１９８８）ヒトＣｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ：Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．）などの文献で論評されているように、他の物理的な染色体のマッピング技術および遺伝地図データと相関することが可能である。遺伝地図データの例は、１９９４ Ｇｅｎｏｍｅ ｉｓｓｕｅ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ（２６５：１９８１ｆ）にある。物理的染色体マップ上での本発明のタンパク質をコードする遺伝子の位置と、特定の疾患または特定の疾患に対する素因との間にある相関性は、遺伝子の疾病に関連するＤＮＡの領域を画定するのに役立ち得る。

【０１０７】

本発明のヌクレオチド配列を用いて、健常者、保有者、または感染者の三者間における遺伝子配列の相違を検出することが可能である。確定した染色体マーカーを用いた、染色体標本および連鎖解析のような物理的なマッピング技術の ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。マウスのような別の哺乳動物種の染色体上への遺伝子の配置は、多くの場合、特定のヒト染色体の数またはアームが未知の場合でさえも、関連するマーカーを明らかにすることが可能である。新配列は、物理的マッピングによって、染色体アーム、またはその部分に指定することができる。これによって、位置クローニングまたは他の遺伝子発見技術を用いて疾病遺伝子を探索する研究者にとって貴重な情報が提供される。一旦疾患または症候群が、特定のゲノム領域への遺伝子連鎖、例えばＡＴ～１１ｑ２２－２３（Ｇａｔｔｉ，Ｒ．Ａ．らの（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３６：５７７－５８０）によって大まかに位置決めがされると、その領域にマッピングする全ての配列は、さらなる研究のための関連遺伝子または調節遺伝子に相当し得る。本発明のヌクレオチド配列を用いて、転座、反転などに起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を検出することができる。

【０１０８】

本発明の別の実施例によれば、本発明のタンパク質、それらの触媒作用断片または免疫抗原断片またはそのオリゴペプチド、生体外モデル、遺伝子操作を受けた細胞または動物を用いて、あらゆる薬剤スクリーニング技術を利用して化合物のライブラリをスクリーニングすることができる。１ つ以上の本発明のタンパク質の作用に結合し、その作用を調節または模倣するリガンドまたは基質を同定することもできる。このようなスクリーニングで用いた本発明のタンパク質またはその断片は、溶液中に遊離していても、固体支持物に付着していても、細胞表面上にあっても、または細胞内にあっても構わない。また、本発明のタンパク質と検査される薬剤間の結合複合物の形成を測定することも可能である。

特に興味深いのは、哺乳動物の細胞に対して低毒性を有する薬剤のスクリーニングアッセイである。本明細書中で使用した用語「薬剤」とは、１つ以上の本発明のタンパク質の生理機能を改変または模倣する能力を有する任意の分子、例えばタンパク質、ペプチドまたは医薬品のことである。候補薬剤は、典型的には有機分子であり、望ましくは５０～約２，５００ドルトンの分子量を有する小有機化合物であるが、幾多の化学的クラスを包含する。候補薬剤には、タンパク質、特に水素結合との構造上での相互作用に必要な機能グループが含まれ、そして典型的には少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、望ましくは少なくとも２つの機能化学グループが含まれる。候補薬剤には多くの場合、周期性の炭素または複素環式構造、および／または１ つ以上の上記機能基と置換された芳香族またはポリ芳香族構造を包含する。候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、プリミジン（ｐｙｒｉｍｉｄｉｅｓ）、誘導体、構造上での類似体またはその組み合わせを含んだ生体分子間に見出される。候補薬剤は、合成化合物または天然化合物のライブラリを始めとするさまざまな原料から取得する。例えば、任意に抽出されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を始めとして、さまざまな有機化合物および生体分子のランダム合成および指向性合成のための多くの手段が提供されている。或いは、細菌、真菌、植物、および動物抽出物形態の天然化合物のライブラリは入手可能であるか、または容易に作り出すことができる。その上、従来の化学的、物理的、および生化学的な手段を介して、天然または合成的に作り出したライブラリおよび化合物は容易に修飾でき、それらを用いて組み合わせライブラリを作り出すことが可能である。アシル化、アルキル化、エステル化、アミジン化（ａｍｉｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）などのような公知の薬剤は、構造上での類似体を作り出すために、指向性またはランダムな化学的修飾の対象となり得る。スクリーニングアッセイが結合実験である場合、１つ以上の分子が標識に結合することが可能であり、その標識は直接的または間接的に検出可能な信号を提供する。

【０１０９】

使用可能な別の薬剤スクリーニング技術は、公開 ＰＣ

Ｔ 出願番号 ＷＯ８４／０３５６４ に記載されているように、目的タンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物の高処理能力スクリーニングを提供する。この方法においては、本発明のタンパク質に対して適用されたように、多数の異なる小さな試験用化合物をプラスチックピンまたは他表面などの固体基質上で提供または合成する。試験用化合物は、本発明のタンパク質またはその断片と反応させ、洗浄した。次に、結合した本発明のタンパク質を当分野で周知の方法で検出した。また、精製した本発明のタンパク質は、前記の薬剤スクリーニング技術で使用するプレート上で直接被覆することもできる。あるいは、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物上に固定することもできる。別の実施例によれば、タンパク質と結合可能な中和抗体が本発明のタンパク質と結合するため試験化合物と特に競合し、競合薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では抗体を用いて、本発明のタンパク質と１つ以上の抗原決定因子を共有する全てのペプチドの存在を検出することができる。別の実施例では、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、その新規技術が既知のヌクレオチド配列の特性、例えば、限定するものではないが、トリプレット遺伝暗号および特異的塩基対の相互作用などを含む特性に依存する限り、今後開発される任意の分子生物学技術においてでも使用することができる。

【０１１０】

本発明のタンパク質をコードする核酸を用いて遺伝子導入細胞株および動物を作成することができる。これらの遺伝子導入非ヒト動物は、本発明のタンパク質の試験管内の機能および調節の研究において有用である。遺伝子導入動物、特に哺乳動物の遺伝子導入動物は、ヒトに共通する多くの発生プロセスおよび細胞プロセスの検討のためのモデル系として役立つことができる。代謝障害を有する種々の非ヒトモデルを用いて、本発明のタンパク質の修飾因子を検査することができる。本発明のタンパク質の異所性発現（例えば過剰発現または発現の欠如）、特定の摂食条件、および／または生物学的活性化合物の投与により、代謝障害のモデルを作ることができる。

【０１１１】

本発明の一実施例によれば、そのようなアッセイでは、レプチン経路遺伝子においてノックアウトを保有しているマウスのようなインスリン耐性および／または糖尿病のマウスモデルが使用される （例えば、ｏｂ （レプチン）またはｄｂ （レプチン受容体）マウス）。糖尿病の典型的な症状を呈するそのようなマウスは、肝脂質蓄積を示し、そして高い頻度で血漿脂質値を増加した（Ｂｒｕｎｉｎｇらの １９９８、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．２：４４９－５６９を参照）。感受性の野生型マウス（例えばＣ５７Ｂｌ／６）は、高脂肪食を与えた場合、類似の症状を示す。そのようなマウス菌株における本発明のタンパク質の発現の検査に加えて、これらのマウス用いて、候補修飾因子の投与が、例えば肝臓、血漿、または脂肪組織における脂質蓄積を改変するかどうかを、ＦＰＬＣ、比色測定法、血糖レベル検査、インスリン耐性検査のようなおよびその他のような当技術分野で周知の標準測定法を用いて検査することもできる。

【０１１２】

遺伝子導入動物は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の正常な遺伝子座が突然変異する場合、非ヒト胚幹細胞における相同組換えを介して作ることが可能である。別法としては、タンパク質をコードする核酸構成物を卵母細胞に注入し、ゲノムにランダムに統合する。また、本発明の遺伝子またはその変異体を、通常には発現されないか、または異常発生するような場所に発現することもあり得る。さらには、アンチセンス分子を発現する特異的な構成物または本発明のタンパク質の発現を阻止または改変する優性阻害突然変異の発現のような本発明の遺伝子の変異体は、ランダムにゲノムに統合することが可能である。本発明の遺伝子発現の上方制御が表現型の容易に検出可能な変化を結果としてもたらすｌａｃＺまたはルシフェラーゼのような検出可能なマーカーは、本発明遺伝子の遺伝子座に導入することが可能である。安定した統合のベクターには、プラスミド、レトロウィルスなど動物ウィルス、酵母菌人工染色体（ＹＡＣｓ）などが含まれる。

【０１１３】

相同組換えＤＮＡ構成物には、少なくとも所望の遺伝子組換えをした本発明の遺伝子の一部が含まれ、そして標的遺伝子座に対する相同領域が含まれるであろう。都合よく、ポジティブ選択およびネガティブ選択用のマーカーを含む。ランダム統合のためのＤＮＡ構成物には、組換えを仲介するための相同領域が含まれる必要はない。ランダム統合のためのＤＮＡ構成物には、本発明のタンパク質、調節エレメント（プロモーター）、イントロンおよびポリアデニル化信号をコードする核酸から成る。相同組換えを通して標的遺伝子修飾を有する細胞を作成する方法は本分野で周知である。胚幹（ＥＳ）細胞は、ＥＳ細胞株を用いても良いし、または胚細胞を宿主、例えばマウス、ラット、モルモットなどから新たに取得しても良い。そのような細胞は、適切な線維芽細胞－支持細胞層の上で増殖さしめてから、白血病抑制因子（ＬＩＦ） の存在下で増殖する。

【０１１４】

ＥＳ 細胞または胚細胞または体細胞の多能性ヒト幹細胞を形質転換する場合、それらの細胞を用いて遺伝子導入動物を作り出すことが可能である。形質転換後、細胞を適切な培地の支持細胞層にプレーティングする。その構成物を含んでいる細胞は、選択培地を用いることによって選択することが可能である。コロニーを十分な時間をかけて増殖した後、コロニーを摘出し、相同性組換え

または構成物の統合の発生率を分析する。陽性反応を示すコロニーは、胚操作および胚盤胞注入に用いることが可能である。胚盤胞は、４～６週間の過排卵雌から取得する。ＥＳ細胞をトリプシン処理し、そして修飾細胞を胚盤胞の胞胚腔に注入する。注入後、胚盤胞を偽妊娠雌の各子宮角へ戻す。次に、雌に出産させ、結果として得られた子孫をその構成物に対してスクリーニングした。胚盤胞の異なる表現型および遺伝子操作された細胞を提供することで、キメラ子孫を容易に検出することができる。キメラ動物を修飾遺伝子の存在に対してスクリーニングし、修飾を有する雄と雌を交尾させ、ホモ接合性の子孫を産生する。その遺伝子改変が成長の過程における死亡率の原因となる場合には、組織または器官は、同種間移植用または類遺伝子性移植用、または移植、または体外培養用として維持することができる。遺伝子導入動物は、実験動物、家畜などのような任意の非ヒト哺乳動物である。遺伝子導入動物は、機能研究、薬物スクリーニングなどにおいて使用することが可能である。

【０１１５】

また、最終的に、本発明は少なくとも下記の １つから成るキットに関するものである。

（ａ） 核酸分子またはその機能的断片；

（ｂ） アミノ酸分子または機能的断片またはそのアイソフォーム；

（ｃ） （ａ） の核酸を備えているベクター；

（ｄ） （ａ） の核酸または（ｂ） のベクターを含む宿主細胞；

（ｅ） （ａ） の核酸によってコードされたポリペプチド；

（ｆ） （ａ） の核酸によってコードされた融合ポリペプチド；

（ｇ） （ａ） の核酸または（ｄ）または（ｅ） のポリペプチドに対する抗体、アプタマーまたは別の受容体および

（ｈ） （ａ） の核酸アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【０１１６】

本キットは、上述のように、診断用または治療用またはスクリーニング用に使用することが可能である。本キットには、さらに取扱説明書が含まれる場合がある。

【図面の簡単な説明】

【０１１７】

【図１Ａ】図１Ａは、ニワトリ胚 （５ 日目、ｄｐｂ ＝ 背側膵芽、ｖｂｐ ＝ 腹側膵芽、ｓｔ ＝ 胃腸、ｎｔ ＝ 神経管上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。

【図１Ｂ】図１Ｂは、ヒト ＤＰ１１９ の発現を示す。

【図２Ａ】図２Ａは、ヒトＤＫＦＺｐ５８６Ｌ１５１ に対するニワトリ遺伝子相同性の ３’ を含有する核酸配列を示す。

【図２Ｂ】図２Ｂは、図１Ａに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質の配列を示す。

【図２Ｃ】図２Ｃは、ヒトホモログのタンパク質をコードする 核酸配列を示す。

【図２Ｄ】図２Ｄは、図２に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。

【図２Ｅ】図２Ｅは、マウスホモログのタンパク質をコードする核酸配列を示す。

【図２Ｆ】図２Ｆは、図８Ｅに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。

【図２Ｇ－１】図２Ｇは、異なる種から取り出した ＤＰ１１９ のアライメントを示す。

【図２Ｇ－２】図２Ｇは、異なる種から取り出した ＤＰ１１９ のアライメントを示す。

【図２Ｇ－３】図２Ｇは、異なる種から取り出した ＤＰ１１９ のアライメントを示す。

【図２Ｇ－４】図２Ｇは、異なる種から取り出した ＤＰ１１９ のアライメントを示す。

【図２Ｇ－５】図２Ｇは、異なる種から取り出した ＤＰ１１９ のアライメントを示す。

【図３Ａ】図３Ａは、受精後 ３．５ 日目のニワトリ胚および ＤＰ４４４ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。

【図３Ｂ】図３Ｂは、受精後 ４ 日目のニワトリ胚および ＤＰ４４４ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。

【図３Ｃ】図３Ｃは、受精後 ５ 日目のニワトリ胚および ＤＰ４４４ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。

【図３Ｄ】図３Ｄは、発育中の膵臓 （受精後 ５ 目のニワトリ） 断面の二重標識を示す。

【図３Ｅａ】図３Ｅａは、制御アンチセンスオリゴを投与した受精後 ２４ 時間目の胚を示す。

【図３Ｅｂ】図３Ｅｂは、ＤＰ４４４ の翻訳をブロッキングするアンチセンスオリゴを投与した受精後 ２４ 時間目の サカナ胚を示す。

【図４Ａ】図４Ａは、核酸配列を示す。

【図４Ｂ】図４Ｂは、ＤＰ４４４のアミノ酸配列を示す。

【図４Ｃ】図４Ｃは、ヒトホモログＱＶ２－ＮＮ２００６－２３０４０１－６２８－ｄ０６ ＮＮ２００６、配列番号 ９ の核酸配列を示す。

【図４Ｄ】図４Ｄは、ＤＰ４４４ （配列番号 １０） のヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

【図４Ｅ】図４Ｅは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＢＦ９５１８１７ の核酸配列を示す。

【図４Ｆ】図４Ｆは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＡＩ２１４４８０．１ の核酸配列を示す。

【図４Ｇ】図４Ｇは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿１ の予測 ｍＲＮ

47

Aを示す。
【図４Ｈ】図４Ｈは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿１ の予測タンパク質を示す。
【図４Ｉ－１】図４Ｉは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿３ の予測ｍＲＮＡを示す。
【図４Ｉ－２】図４Ｉは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿３ の予測ｍＲＮＡを示す。
【図４Ｉ－３】図４Ｉは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿３ の予測ｍＲＮＡを示す。
【図４Ｊ】図４Ｊは、ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿３ の予測タンパク質を示す。
【図４Ｋ－１】図４Ｋは、異なる種から取り出した ＤＰ４４４ のアライメントを示す。
【図４Ｋ－２】図４Ｋは、異なる種から取り出した ＤＰ４４４ のアライメントを示す。
【図５Ａ】図５Ａは、ニワトリ胚 （５ 日目） 上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図５Ｂ】図５Ｂは、ニワトリ胚 （５ 日目） 上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図５Ｃ】図５Ｃは、発育中の膵臓 （受精後 ５ 日目のニワトリ） の断面上での ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図５Ｄ】図５Ｄは、発育中の膵臓 （受精後 ５ 日目のニワトリ） の断面上での ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図６Ａ－１】図６Ａは、ＤＰ８１０ タンパク質. ３' 非翻訳領域は下線を引いて示す。
【図６Ａ－２】図６Ａは、ＤＰ８１０ タンパク質. ３' 非翻訳領域は下線を引いて示す。
【図６Ｂ】図６Ｂは、図６Ａに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質の配列を示す。
【図６Ｃ】図６Ｃは、ヒトホモログ ＤＰ８１０ タンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図６Ｄ】図６Ｄは、図６Ｃに示したコーディング配列によってコードされた タンパク質配列を示す。
【図７Ａ】図７Ａは、ニワトリ胚 （Ａ： 受精後 ４ 日目； Ｂ： 受精後 ５ 日目） 上でのホールマウントｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図７Ｂ】図７Ｂは、ニワトリ胚 （Ａ： 受精後 ４ 日目； Ｂ： 受精後 ５ 日目） 上でのホールマウントｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図７Ｃ】図７Ｃは、ヒトＤＰ６８５ の発現を示す。
【図８Ａ】図８Ａは、ニワトリＤＰ６８５ タンパク質

48

をコードする核酸配列を示す。
【図８Ｂ】図８Ｂは、図８Ａに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図８Ｃ】図８Ｃは、ヒトホモログの ＤＰ６８５ タンパク質（オートタキシン） をコードする核酸配列を示す。
【図８Ｄ】図８Ｄは、図８Ｃに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図８Ｅ】図８Ｅは、マウスホモログＤＰ６８５ タンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図８Ｆ】図８Ｆは、図８Ｅに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図９Ａ】図９Ａは、ニワトリ胚 （受精後 ５ 日目） 上のホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図１０Ａ】図１０Ａは、ニワトリコレクチンの ３' 非翻訳領域から成る核酸配列を示す。
【図１０Ｂ】図１０Ｂは、図６Ａに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図１０Ｃ】図１０Ｃは、ヒトホモログコレクチン ＣＯＬＥＣ１０ タンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図１０Ｄ】図１０Ｄは、図１０Ｃに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図１１Ａ】図１１Ａは、ニワトリ胚 （受精後 ５ 日目） 上のホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図１１Ｂ】図１１Ｂは、発育中の膵臓 （受精後 ５ 日目） 断面上の二重標識を示す。
【図１２Ａ】図１２Ａは、核酸配列を示す。
【図１２Ｂ】図１２Ｂは、図１２Ａに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図１２Ｃ】図１２Ｃは、ヒトホモログタンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図１２Ｄ】図１２Ｄは、図１２Ｃに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図１３Ａ】図１３Ａは、受精後 ５ 日目 ニワトリ胚およびＲＡ９７７ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図１３Ｂ】図１３Ｂは、受精後 ５ 日目 ニワトリ胚およびＲＡ９７７ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図１４Ａ－１】図１４Ａは、ＲＡ９７７ の核酸配列を示す。
【図１４Ａ－２】図１４Ａは、ＲＡ９７７ の核酸配列を示す。
【図１４Ｂ】図１４Ｂは、ＲＡ９７７ のアミノ酸配列を示す。
【図１４Ｃ】図１４Ｃは、ホモサピエンス上皮膜タンパク質 ２ （ＥＭＰ２）、ｍＲＮＡの核酸配列を示す。

49

【図１４Ｄ】図１４Ｄは、ＥＭＰ２＿ヒト上皮 膜タンパク質 ２ （ＥＭＰ－２） （ＸＭＰ タンパク質） のアミノ酸配列を示す。
【図１５Ａ】図１５Ａは、ニワトリ胚 （受精後 ５ 日目） 上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。
【図１６Ａ】図１６Ａは、ニワトリ ＲＡ７７０ タンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図１６Ｂ】図１６Ｂは、図１６Ａに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図１６Ｃ】図１６Ｃは、ヒトホモログＲＡ７７０ タンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図１６Ｄ】図１６Ｄは、図１６Ｃに示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列を示す。
【図１６Ｅ】図１６Ｅは、マウスホモログＲＡ７７０ タンパク質をコードする核酸配列を示す。
【図１６Ｆ】図１６Ｆは、図１６Ｅに示したコーディング配列によってコードされた タンパク質配列を示す。
【０１１８】
図 １： ＤＰ１１９ タンパク質に対する ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションの結果。
図 １Ａ は、ニワトリ胚 （５ 日目、ｄｐｂ ＝ 背側膵芽、ｖｂｐ ＝ 腹側膵芽、ｓｔ ＝ 胃腸、ｎｔ ＝ 神経管上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す； Ｆｉｇ １Ｂ は、発育中の膵臓組織切片上での ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。ＤＰ２９３ 陽性細胞は青色で示し、インスリンは茶色で染色した）。発現は、膵島 （ｉｓ） および膵臓上皮および管細胞 （ｄｕ） の一部の細胞で見ることができる。Ｆｉｇ １Ｃ は、ハイブリダイゼーションによって ＤＰ１１９ 発現に対して染色された受精後 ５ 日目のニワトリの背側部の断面を示す。染色は、分散している神経管 （ｎｔ） 細胞および神経管を囲む神経節性細胞において明らかである。
図 １Ｂ は、ヒト ＤＰ１１９ の発現を示す。ここに示したのは、前脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化中のヒト腹部脂肪細胞における ＤＰ１１９ 発現の定量分析である。
【０１１９】
図 ２： ＤＰ１１９ 配列.
図 ２Ａ： ヒトＤＫＦＺｐ５８６Ｌ１５１ に対するニワトリ遺伝子相同性の ３’ を含有する核酸配列 （配列番号 １）。下線を引いたのは ３' 非翻訳領域であり、終止コドンは太字で示した。
図 ２Ｂ： 図 １Ａ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質の配列（配列番号 ２）。
図 ２Ｃ： ヒトホモログのタンパク質をコードする 核酸配列（配列番号 ３） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＡＬ０５０１３７．１）。
図 ２Ｄ： 図 ２Ｃ に示したコーディング配列によって

50

コードされたタンパク質配列（配列番号 ４） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＣＡＢ４３２８６．１）。
図 ２Ｅ： マウスホモログのタンパク質をコードする核酸配列 （配列番号 ５） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＢＣ０２５６５４．１）。
図 ２Ｆ： 図 ８Ｅ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ６） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ａａｈ２５６５４．１）。
図 ２Ｇ： 異なる種から取り出した ＤＰ１１９ のアライメント （Ｍｍ、マウス； Ｈｓ、ホモサピエンス； Ｄｒ、ゼブラダニオ Ｄａｎｉｏ ｒｅｒｉｏ； Ｇｇ、ニワトリ）
【０１２０】
図 ３： ＤＰ４４４ の発現
図 ３Ａ： 受精後 ３．５ 日目のニワトリ胚および ＤＰ４４４ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション。発現は、神経管 （ｎｔ） に沿って、および体節、発育中の腸 （ｉｎ） および鰓弓において観察される。
図 ３Ｂ： 受精後 ４ 日目のニワトリ胚および ＤＰ４４４ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション。発現は、神経管 （ｎｔ） に沿って、および体節、発育中の腸 （ｉｎ） および背側菱脳 （ｈｂ） において観察される。
図 ３Ｃ： 受精後 ５ 日目のニワトリ胚および ＤＰ４４４ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション。胃腸 （ｓｔ） および膵芽 （ｄｐｂ、ｖｐｂ） における発現ドメインを示す。
図 ３Ｄ： 発育中の膵臓 （受精後 ５ 目のニワトリ） 断面の二重標識。インスリンは茶色に染色し、ＤＰ４４４ 発現は紫色に染色する。ＤＰ４４４ の発現は、積極的にインスリン発現とオーバーラップしている膵島 （ｉｓ） で観察できる。
図 ３Ｅ： ＤＰ４４４ 機能低下はゼブラフィッシュにおける膵島欠損につながる。図 ３Ｅａ は、制御アンチセンスオリゴを投与した受精後 ２４ 時間目の胚を示し、図 ３Ｅｂは、ＤＰ４４４ の翻訳をブロッキングするアンチセンスオリゴを投与した受精後 ２４ 時間目のサカナ胚を示す。インスリン発現は紫色に染色する。
【０１２１】
図 ４： ＤＰ４４４ 配列。
図 ４Ａ： 核酸配列 （配列番号 ７）。終止コドンは太字で示し、および ３' ＵＴＲ には下線を引いた。
図 ４Ｂ： ＤＰ４４４のアミノ酸配列 （配列番号 ８）。
図 ４Ｃ： ヒトホモログＱＶ２－ＮＮ２００６－２３０４０１－６２８－ｄ０６ ＮＮ２００６、配列番号 ９ の核酸配列 （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｂ

51

Ｉ０３５２９６）。
図 ４Ｄ： ＤＰ４４４ （配列番号 １０） のヒトホモログのアミノ酸配列 （配列番号 ９ の翻訳）。
図 ４Ｅ： ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＢＦ９５１８１７ の核酸配列 （ＱＶ１－ＮＮ０２２８－０９１１００－４３６－ｇ０５ ＮＮ０２２８ ホモサピエンス、配列番号 １１）。
図 ４Ｆ： ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＡＩ２１４４８０．１ の核酸配列；（ｑｇ６９ｃ１２．ｘ１ Ｓｏａｒｅｓ＿ＮＦＬ＿Ｔ＿ＧＢＣ＿Ｓ１ ホモサピエンス、配列番号 １２）。
図 ４Ｇ： ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿１ の予測 ｍＲＮＡ （配列番号 １３）。
図 ４Ｈ： ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿１ の予測タンパク質 （配列番号 １４）。
図 ４Ｉ： ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿３ の予測ｍＲＮＡ （配列番号 １５）。
図 ４Ｊ： ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｈｓ２＿５１９１＿２８＿４＿３ の予測タンパク質 （配列番号 １６）。
図 ４Ｋ： 異なる種から取り出した ＤＰ４４４ のアライメント （Ｄｒ、ゼブラフィッシュ； Ｍｍ、マウス； Ｈｓ、ホモサピエンス； Ｇｇ、ニワトリ）
【０１２２】
図 ５： ＤＰ８１０ タンパク質に対する ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションの結果
図 ５Ａ および 図 ５Ｂ は、ニワトリ胚 （５ 日目） 上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。ｌｉ ＝ 肝臓、ｈｔ ＝ 心臓、ｄｐｂ ＝ 背側膵芽；
図 ５Ｃ および 図 ５Ｄ は、発育中の膵臓 （受精後 ５ 日目のニワトリ） の断面上での ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。ｐｅ ＝ 膵臓上皮、ｉｓ ＝ 膵島、ｐｍ ＝ 膵臓の間充織.
【０１２３】
図 ６： ＤＰ８１０ 配列。
図 ６Ａ： ＤＰ８１０ タンパク質． ３' 非翻訳領域は下線を引いて示し、終止コドンは太字で示した。（配列番号 １７）
図 ６Ｂ： 図 ６Ａ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質の配列（配列番号１８）。
図 ６Ｃ： ヒトホモログ ＤＰ８１０ タンパク質をコードする核酸配列 （配列番号 １９） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿０２４００．１； 多ドメインタンパク質）。
図 ６Ｄ： 図 ６Ｃ に示したコーディング配列によってコードされた タンパク質配列（配列番号 ２０） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＰ＿０７８７７６．１）。

52

【０１２４】
ＦＩＧ ７： ＤＰ６８５ タンパク質の発現。
図 ７Ａ および 図 ７Ｂ は、ニワトリ胚 （Ａ： 受精後 ４ 日目； Ｂ： 受精後 ５ 日目） 上でのホールマウントｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。図 ７Ａ では、発現が、背側神経管 （ｎｔ） に沿って、背側前脳 （ｆｂ） および菱脳 （ｈｂ） において、鰓弓 （ｂａ） および発育中の後肢 （ａｈｌ） の前部において観察される。
また、強力なシグナルが、発育中の胃腸 （ｓｔ） の領域においても観察される。図 ７Ｂ では、発現が、発育中の胃腸 （ｓｔ） および背側膵芽 （ｄｐｂ） において観察される。
図 ７Ｃ は、ヒトＤＰ６８５ の発現を示す。ここに示したのは、前脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化中のヒト腹部脂肪細胞における ＤＰ６８５ 発現の定量分析である。
【０１２５】
図 ８： ＤＰ６８５ 配列。
図 ８Ａ： ニワトリＤＰ６８５ タンパク質をコードする核酸配列（配列番号 ２１）。
図 ８Ｂ： 図 ８Ａ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列 （配列番号 ２２）。
図 ８Ｃ： ヒトホモログの ＤＰ６８５ タンパク質（オートタキシン） をコードする核酸配列 （配列番号 ２３）。
図 ８Ｄ： 図 ８Ｃ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ２４）。
図 ８Ｅ： マウスホモログＤＰ６８５ タンパク質をコードする核酸配列（配列番号 ２５）。
図 ８Ｆ： 図 ８Ｅ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ２６）。
【０１２６】
ＦＩＧ ９： ＷＥ４７４ タンパク質に対する ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションの結果。
図 ９Ａ は、ニワトリ胚 （受精後 ５ 日目） 上のホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。ｉｎ ＝ 腸、ｌｉ ＝ 肝臓原基；
【０１２７】
図 １０： ＷＥ４７４ 配列.
図 １０Ａ： ニワトリコレクチンの ３' 非翻訳領域から成る核酸配列（配列番号 ２７）。
図 １０Ｂ： 図 ６Ａ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ２８）。
図 １０Ｃ： ヒトホモログコレクチン ＣＯＬＥＣ１０ タンパク質をコードする核酸配列（配列番号 ２９）（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿００６４３８．２）。

図 １０Ｄ： 図 １０Ｃ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ３０）（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＰ＿００６４２９．１）。

【０１２８】

ＦＩＧ １１： ＤＰ１６０ タンパク質に対する ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションの結果。

図 １１Ａ は、ニワトリ胚 （受精後 ５ 日目） 上のホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す。ＤＰ１６０ は、神経管 （ｎｔ） に沿って、中腎 （ｍｎ） においておよび発育中の消化管 （胃腸 ： ｓｔ； 背側膵芽および腹側膵芽：ｄｐｂ、ｖｐｂ） において発現される。

図 １１Ｂ． 発育中の膵臓 （受精後 ５ 日目） 断面上の二重標識を示す。インスリンは茶色に染色し、ＤＰ１６０ 発現は紫色に染色する。発現は、膵島 （ｉｓ） および膵臓上皮細胞で見ることができる。

【０１２９】

図 １２： ＤＰ１６０ 配列。

図 １２Ａ： 核酸配列 （配列番号 ３１）

図 １２Ｂ： 図 １２Ａ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ３２）。

図 １２Ｃ： ヒトホモログタンパク質をコードする核酸配列 （配列番号 ３３）。

図 １２Ｄ： 図 １２Ｃ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ３４）。

【０１３０】

図 １３： ＲＡ９７７ の発現。

図 １３Ａ および 図 １３Ｂ： 受精後 ５ 日目 ニワトリ胚およびＲＡ９７７ プローブを用いたホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション。ＲＡ９７７ の発現が背側膵芽 （ｄｐｂ） で観察される。胃腸 （ｓｔ） で見られる強力なシグナルは、非特異的なプローブ とラッピングに起因する。同一胚を ２ 通りの異なる拡大率で示す。

【０１３１】

図 １４： ＲＡ９７７ 配列。

図 １４Ａ： ＲＡ９７７ の核酸配列（配列番号 ３５）。終止コドンおよび開始コドンは太字で表し、ＵＴＲ には下線を引いた。

図 １４Ｂ： ＲＡ９７７ のアミノ酸配列 （配列番号 ３６）。

図 １４Ｃ： ホモサピエンス上皮膜タンパク質 ２ （ＥＭＰ２）、ｍＲＮＡ の核酸配列 （ＧＥＮＢＡＮＫ アクセッション番号 ＸＭ＿０３０２１８．１； 配列番号 ３７）。

図 １４Ｄ： ＥＭＰ２＿ヒト上皮 膜タンパク質 ２ （ＥＭＰ－２） （ＸＭＰ タンパク質） のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 Ｐ５４８５１； 配列番号 ３８）。

【０１３２】

図 １５： ＲＡ７７０ タンパク質に対する ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションの結果。

図 １５Ａ は、ニワトリ胚 （受精後 ５ 日目） 上でのホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションを示す 。ｄｐｂ ＝ 背側膵芽； ｖｐｂ ＝ 腹側膵芽； ｌｕ ＝肺臓、ｓｔ ＝ 胃腸領域； ｄｄ ＝ 十二指腸

【０１３３】

図 １６： ＲＡ７７０ 配列。

図 １６Ａ： ニワトリ ＲＡ７７０ タンパク質をコードする核酸配列 （配列番号 ３９）

図 １６Ｂ： 図 １６Ａ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ４０）。

図 １６Ｃ： ヒトホモログＲＡ７７０ タンパク質をコードする核酸配列 （配列番号 ４２）（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿００４５５８．１； Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ）。

図 １６Ｄ： 図 １６Ｃ に示したコーディング配列によってコードされたタンパク質配列（配列番号 ４３）（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＰ＿００４５４９．１）。

図 １６Ｅ： マウスホモログＲＡ７７０ タンパク質をコードする核酸配列 （配列番号 ４４）（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＭ＿００８７３８．１； Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ）。

図 １６Ｆ： 図 １６Ｅ に示したコーディング配列によってコードされた タンパク質配列（配列番号 ４４）（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＰ＿０３２７６４．１）。

【０１３４】

下記の実施例は、本発明を説明するために提供されており、本発明を限定するものではない。

【０１３５】

実施例 １： ＤＰｄ６ ヒヨコの ｃＤＮＡ ライブラリ構造

ニワトリ ＤＰｄ６ の ｃＤＮＡ ライブラリは、６ 日目のニワトリ胚から採取した背側膵芽を使用して構築したものである。凍結組織はホモジナイズかつ溶解した。Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ ＰＯＬＹＴＲＯＮ ｈｏｍｏｇｅｎｉｚｅｒ ＰＴ－３０００（Ｂｒｉｎｋｍａｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ， Ｗｅｓｔｂｕｒｙ， Ｎ．Ｊ．）をグラニジウム イソチオシアネート溶液において使用した。溶解物に遠心力 ５．７ Ｍ ＣｓＣｌ 以上をかける。Ｂｅｃｋｍａｎ ＳＷ２８ ローター、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｌ８－７０Ｍ 超遠心分離機 （Ｂｅｃｋｍａｎ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ、Ｃａｌｉｆ．）使用。 １８ 時間、２５，０００ ｒｐｍ、室温。ＲＮＡ を、４．７ ｐＨ 酸フェノールで抽出し、０．３ Ｍ 酢酸ナトリウムと容積 ２．５ のエタノール沈殿さ

55

せ、無 RNA 水で再懸濁し、３７℃ にてDNAe 処理した。以前の通り RNA を４．７ pH 酸フェノールで繰返し抽出し、酢酸ナトリウムおよびエタノールで沈殿させた。 その後、Ｍｉｃｒｏ－ＦａｓｔＴｒａｃｋ ２．０ mRNA 分離キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を使用して mRNA を単離し、ｃDNA ライブラリを構築するために使用した。mRNAs の取り扱いは、ＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ ｃDNA ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｐｌａｓｍｉｄ ｃｌｏｎｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ（Ｇｉｂｃｏ／BRL） の推奨プロトコルに従って行なった。DH１０B 宿主細胞への形質転換に続いて、単一コロニーを摘出し、PCR 法を用いてクローン化された ｃDNA インサートを増幅した。単一 ｃDNA インサートを代表する PCR 法によって増幅された断片を、その後に生体外転写し、Ｄｉｇｏｘｙｇｅｎｉｎ 標識 RNA プローブ（Ｒｏｃｈｅ）を生成した。RNA プローブをホールマウント ｉｎ－ｓｉｔｕ スクリーニングにおいて使用して初期のニワトリ胚におけるそれぞれの遺伝子産物の発現を確定した。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を含有するプラスミドを、膵臓組織におけるその高発現のおかげで同定した。

【０１３６】

実施例 ２： ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション

当業者であれば周知の標準プロトコルおよび以前に説明した（例えば、Ｐｅｌｔｏｎ，Ｒ．Ｗ． らの（１９９０） Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １１０， ６０９－６２０、Ｂｅｌｏ， Ｊ．Ａ． らの（１９９７） Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖ． ６８， ４５－５７） に従って ｉｎ－ｓｉｔｕ ハイブリッド形成法を実行した。

【０１３７】

実施例 ３： ｃDNA クローンの分離およびシーケンシング

ＲＥＡＬ プレP ９６ ウェルのプラスミド分離キット（ＱＩＡＧＥＮ） を用いて、プラスミドDNA を細胞から開放し精製した。このキットは、多重試薬ディスペンサーを使用した９６ ウェル ブロックにおいて、９６ 個のサンプルの同時精製を可能にした。 下記の変更を除いてメーカーの推奨するプロトコルを使用した。変更（ｉ）： 細菌を１ ｍｌ の消毒した Ｔｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ （ＬＩＦＥ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳＴＭ， Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ， Ｍｄ， ＵＳＡ）でカルベニシリンを ２５ ｍｇ／Ｌ で、グリセロームを ０．４ ％ で用いて培養した。変更（ｉｉ）： 接種後、培養を １９ 時間インキュベートした後、細胞を ０．３ ｍｌ 溶解バッファで溶解した。変更（ｉｉｉ）： イソプロパノール沈殿に続いて、プラスミドDNA ペレットを ０．１ ｍｌ の蒸留水で再懸濁した。プロトコルの最後のステップの後、サンプルを ４℃ にて保管する ９６ ウェル ブロックへ移した。ｃDNA を GATC Ｂｉｏｔｅｃｈ ＡＧ （Ｋｏｎｓｔａｎｚ、Ｇｅｒｍａｎｙ）によって、当業者であれば既知の標準プロトコルに従って配列せしめた。

56

【０１３８】

実施例 ４： ｃDNA クローンの相同性検索およびその演繹 タンパク質

リーディング・フレームを決定した後に、本発明のヌクレオチド配列から演繹したアミノ酸配列のみならず、本発明のヌクレオチド配列も、ＧｅｎＢａｎｋ、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ、BLOCKS、および Ｐｉｍａ ＩＩ のようなデータベースに対する問い合わせ配列として使用した。以前に同定され注釈された配列を含むこれらのデータベースで、相同性（類似性） の領域を検索した。使用したのはBLAST（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌの略語、Ａｌｔｓｃｈｕｌ Ｓ．Ｆ． （１９９３） Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ． ３６：２９０－３００； Ａｌｔｓｃｈｕｌ、Ｓ．Ｆ． らの（１９９０） Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ． ２１５：４０３－１０）である。BLAST 検索により、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列両方のアライメントを産生し、配列類似性を決定した。ローカル特性をもつアライメントのおかげで、BLAST 検索は、完全なマッチの決定において、または相同体真核（細菌）または原核（動物、カビ、植物）の起源の識別に特に有用である。ここに引用として取り込まれたＳｍｉｔｈ らの（１９９２、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ５：３５－５１）において説明されたような他のアルゴリズムは、一次配列パターンおよび二次構造ギャップのペナルティーを取り扱う場合に使用された。BLAST 検索の方法は、Ｋａｒｌｉｎ らの（前出）で詳細に説明したように、ここに引用として取り込まれ、問い合わせ配列とデータベース配列との間のマッチを検索した。BLAST 検索によって見出された任意のマッチの統計的な重要性が評価され、重要性をもつユーザ選択限界を満足するマッチのみが報告された。本出願において、限界値はヌクレオチドに対して １０～２５、およびペプチドに対して １０－１４ と設定した。ヌクレオチド配列は、ＧｅｎＢａｎｋ データベースの霊長類、げっ歯類、および他の哺乳動物の配列に対して検索し、それから同一クローンからの演繹アミノ酸配列を、ＧｅｎＢａｎｋ の機能的タンパク質データベースの哺乳動物、脊椎、真核生物の相同性に対して検索した。

【０１３９】

実施例 ５： ポリヌクレオチドの完全長への伸長または調節配列の復元

本発明のタンパク質をコードする完全長核酸配列を用いて、部分的ヌクレオチド配列を完全長に拡張するため、またはゲノム ライブラリから ５' または ３' イントロンまたは他の調節配列を取得するために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計する。単一プライマーを合成

57

してアンチセンス方向における伸長を開始し、他を合成してセンス方向における配列を伸長する。プライマーを用い、領域目的に対して新規ヌクレオチド配列、未知ヌクレオチド配列を含む既知の配列「ｏｕｔｗａｒｄ」生成 ａｍｐｌｉｃｏｎｓ の伸長を促進する。初期プライマーは、オリゴ ４．０６ プライマー分析ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、または別の適切なプログラムを用いて、ヌクレオチド長が２２～３０ となるように、ＧＣ 含有率が ５０％ 以上を有するように、および温度約 ６８℃ ～ ７２℃ で標的配列にアニールするように ｃＤＮＡ から設計した。ヘアピン二量化をもたらすようなヌクレオチドは避けた。元の選択したｃＤＮＡ ライブラリ、またはヒトゲノム ライブラリを用い、配列を伸長した。後者（ヒトゲノム ライブラリ）は5' 上流領域を取得するために最も有用である。より多くの伸長または所望の必要な場合は、追加プライマーセットをデザインして既知領域を伸長する。ＸＬ－ＰＣＲ キット（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ） の指示に従い、充分に酵素および反応混合液を攪拌することによって、高い忠実度増幅を得た。４０ ｐｍｏｌ の各プライマーおよび推奨濃度の他の全ての組成物キットの準備を発端として、Ｐｅｌｔｉｅｒ ｔｈｅｒｍａｌ ｃｙｃｌｅｒ（Ｐｅｌｔｉｅｒ ｔｈｅｒｍａｌ ｃｙｃｌｅｒ（ＰＴＣ２００；Ｍ．Ｊ．Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ、Ｍａｓｓ．）および下記のパラメータを用いて、ＰＣＲ 法を実行した。

【０１４０】

ステップ １ ９４℃ にて、１ 分間 （初期変性）
ステップ ２ ６５℃ にて、１ 分間
ステップ ３ ６８℃ にて、６ 分間
ステップ ４ ９４℃ にて、１５ 秒間
ステップ ５ ６５℃ にて、１ 分間
ステップ ６ ６８℃ にて、７ 分間
ステップ ７： ステップ ４～６ をさらに１５ サイクル繰返す
ステップ ８ ９４℃ にて、１５ 秒間
ステップ ９ ６５℃ にて、１ 分間
ステップ １０ ６８℃ にて、７～１５ 分間
ステップ １１： ステップ ８～１０ を １２ サイクル繰返す
ステップ １２ ７２℃ にて、８ 分間
ステップ １３ ４℃ にて、（保持）

【０１４１】

５～１０ マイクロリットルの反応混合物を、低濃度（約０．６～０．８％）のアガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。最も大きな産生物を保持すると思われた領域を選択して、ゲルから除去した。さらなる精製には、ＱＩＡＱＵＩＣＫ ＤＮＡ 精製キット（ＱＩＡＧＥＮ）などのような商業用ゲル抽出方法が必要とされる。ＤＮＡ の回収後、クレノウ酵素を用い、一本鎖、ヌクレオチド張出部をトリムし、再連結反応およびクローニングを促進する鈍端を作った。エタノール沈殿の後、産生物を１３ マイクロリットルの連結反応バッファに再溶解し、１ マイクロリットルの Ｔ４－ＤＮＡ リガーゼ（１５ 単位）および1 マイクロリットルの Ｔ４ ポリヌクレオチドキナーゼを加え、そして混合物を室温で２～３ 時間または １６℃ で一晩インキュベートした。適格大腸菌細胞（４０ マイクロリットルの適切な 培地中）を ３ マイクロリットルの連結反応 混合物で形質転換し、８０ マイクロリットルのＳＯＣ 媒体（前出のＳａｍｂｒｏｏｋ らの）で培養せしめた。３７ ℃にて １ 時間インキュベーションした後、全形質転換混合液を、２ｘ 炭水化物を含む Ｌｕｒｉａ Ｂｅｒｔａｎｉ （ＬＢ）－寒天（前出のＳａｍｂｒｏｏｋ らの）上にプレートする。次の日、各プレートから幾つかのコロニーをランダムに摘出し、適切な市販の消毒済 ９６ ウェル マイクロタイター プレートの個別ウェルに配置した １５０ マイクロリットルの液体 ＬＢ／２ｘ 炭水化物媒体で培養する。 次の日、一晩培養した ５ マイクロリットルの各培養を 無償毒 ９６ ウェル プレートに移し、１：１０ に水で希釈後、５ マイクロリットルの各サンプルを ＰＣＲ 法 アレーへ移す。ＰＣＲ 法の増幅は、４ 単位の ｒＴｔｈ ＤＮＡ ポリメラーゼ、ベクター プライマー、および １ つまたは両方の伸長反応に使用した遺伝子特定プライマーを含む １８ マイクロリットルの濃縮 ＰＣＲ 法反応混合液（３．３ｘ）を各ウェルに加える。増幅は、下記の条件を用いて実行する：

【０１４２】

ステップ １ ９４℃ にて、６０ 秒間
ステップ ２ ９４℃ にて、２０ 秒間
ステップ ３ ５５℃ にて、３０ 秒間
ステップ ４ ７２℃ にて、９０ 秒間
ステップ ５： ステップ ２～４ をさらに２９ サイクル繰返す
ステップ ６ ７２℃ にて、１８０ 秒間
ステップ ７ ４℃ にて、（保持）

【０１４３】

ＰＣＲ 法反応のアリコットを分子量マーカーと共に寒天ゲル剤上で実行する。ＰＣＲ 産物の寸法を元の部分的ｃＤＮＡ に比較し、適切なクローンを選択し、プラスミドに連結反応して配列する。

【０１４４】

実施例 ６： ハイブリダイゼーションプローブの標識化および使用法

本発明に記載の核酸に由来するハイブリダイゼーションプローブを用いて、ｃＤＮＡ、ゲノム ＤＮＡ、または ｍＲＮＡ をスクリーニングした。約 ２０ 塩基対から成るオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが

59

、より大きなｃＤＮＡ 断片に対しても実質的には同手順を用いる。オリゴヌクレオチドを、ＯＬＩＧＯ４．０６ プライマー分析ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、５０ ｐｍｏｌ の各オリゴマーおよび ２５０ マイクロ Ｃｉ の ［. ｇａｍｍａ. －３２ Ｐ］ アデノシン三リン酸（Ａｍｅｒｓｈａｍ） および Ｔ４ ポリヌクレオチドキナーゼ （ＤｕＰｏｎｔ Ｎｅｎ（ｒ）， Ｂｏｓｔｏｎ， Ｍａｓｓ．）とを組み合わせることにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、ＳＥＰＨＡＤＥＸ Ｇ－２５ 超細繊分子樹脂カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ＆Ｕｐｊｏｈｎ）を用いて十分に精製する。毎分 １０７ カウントの各センス オリゴヌクレオチドおよびアンチセンス オリゴヌクレオチドを含む部分を、（Ａｓｅ Ｉ， Ｂｇｌ ＩＩ， ＥｃｏＲＩ， Ｐｓｔ Ｉ， Ｘｂａ Ｉ， ｏｒ Ｐｖｕ ＩＩ ； ＤｕＰｏｎｔ ＮＥＮ（ｒ）） の １ つの膜で消化されたヒトゲノム ＤＮＡ の典型的膜ベースのハイブリダイゼーション解析において用いる。各消化物から得た ＤＮＡ は、０．７％ アガロースゲル上で分画してナイロン膜（ＮＹＴＲＡＮ ＰＬＵＳ ｍｅｍｂｒａｎｅ， Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ＆Ｓｃｈｕｅｌｌ， Ｄｕｒｈａｍ， Ｎ．Ｈ．）に移す。スクリーニングハイブリダイゼーションは４０℃にて １６ 時間かけて行う。非特異的シグナルを取り除くため、最大 ０．１ ｘクエン酸食塩水（ＳＳＣ）および ０．５％ ドデシル硫酸ナトリウムの一層ストリンジェントな条件の下、ブロットを順次室温にて洗浄する。ＸＯＭＡＩ ＡＲ オートラジオグラフィーフィルム （Ｋｏｄａｋ Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ、Ｎ．Ｙ．）をブロットに晒した後、またはブロットを ＰＨＯＳＰＨＯＩＭＡＧＥＲ （Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ、Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ、Ｃａｌｉｆ．）に数時間置いた後にオートラジオグラフィーパターンを肉眼で比較する。

【０１４５】

実施例 ７： アンチセンス分子

本発明のタンパク質をコードする配列、またはその一部に対するアンチセンス分子を用い、生体内または試験管内の天然の本発明のタンパク質の発現を抑制する。約 ２０ 塩基対を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用は、特に記載するが、より大きなｃＤＮＡ 断片に使用される手順と本質的に同一である。オリゴヌクレオチドを用いて、天然の本発明のタンパク質の発現を抑制する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは多数の方法で遺伝子機能を抑制することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、転写物の ５'ＵＴＲ に結合して、翻訳をブロッキングすることができる。あるいは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの結合は、ＲＮＡｓｅＨ による転写物の切断を誘発することもできる。また、アンチセンスオリゴが、プレ－ｍＲＮＡ のスプライシングをブロッキングすることも証明されており、その結果、特異的なスプライス形態の形成がブロッキングされるか、またはスプライシングされていない、成熟タンパク質を作ることができない不安定なメッセージの蓄積につながるかのいずれか、またはその両方が起こり得る。特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用機構は、オリゴヌクレオチドの化学組成および／または標的転写物内の結合部位によって決定される。

60

【０１４６】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、組織培養細胞に適用すること、動物に使用すること、またはヒトの治療に用いることができる。発育初期のゼブラフィッシュまたはアフリカツメガエル胚への投与することにより、これらの種における遺伝子機能の好都合な分析が可能となる。

【０１４７】

実施例 ８： 本発明のタンパク質の発現

本発明のタンパク質および相同タンパク質のような本発明のタンパク質の発現は、ｃＤＮＡ の適切なベクターへのサブクローニングおよびベクターの宿主細胞への形質転換によって達成する。この場合、以前に ｃＤＮＡ ライブラリを作成するために使用したクローンニングベクター、ＰＳＰＯＲＴ １ を用いて、大腸菌において本発明のタンパク質を発現させる。クローンニング部位の上流では、このベクターにはプロモーター βガラクトシダーゼ、継いで、アミノ末端 Ｍｅｔ を含有する配列、およびその結果生じた βガラクトシダーゼの ７ 残基が含まれる。これらの ８ 残基の直後に続くのは、転写に有用なバクテリオファージ プロモーター、および多数のユニークな制限部位を含むリンカーである。標準方法を使用するＩＰＴＧ を有する単離形質転換細菌株の誘発は、β－ガラクトシダーゼの最初の８ つの残基から成る融合タンパク質、約 ５～１５ のリンカー残基、および全長タンパク質を産生する。シグナル残基は、活性化のため下記のアッセイで直接使用することができる細菌の成長培地中に本発明のタンパク質の分泌物を誘導する。

【０１４８】

実施例 ９： 本発明のタンパク質に特異的な抗体の産生

ＰＡＧＥ 電気泳動法（前出の Ｓａｍｂｒｏｏｋ）または他の精製技術を用いて十分に精製した本発明のタンパク質を用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産生する。ＤＮＡＳＴＡＲアミノ酸配列をＤＮＡＳＴＡＲソフトウェア（ＤＮＡＳＴＡＲ 社）を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴポリペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を産生する。Ｃ末端に近傍するエピトープ、または親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については前出のＡｕｓｕｂｅｌ らによって説明されている。

61

【０１４９】
通常は、オリゴペプチドの長さは約 １５ 残基であり、Ｆｍｏｃ 化学反応を用いる Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ４３１Ａ ｐｅｐｔｉｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ４３１Ａ を用いて合成し、Ｎ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ、前出の Ａｕｓｕｂｅｌ）を用いた反応によってキーホールリンペットヘモシニアン（ＫＬＨ, Ｓｉｇｍａ, Ｓｔ. Ｌｏｕｉｓ, Ｍｏ.） に結合せしめる。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド－ＫＬＭ 複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性に対する検査は例えば、ペプチドをプラスチックに結合し、１％ ＢＳＡ を用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、そして放射性ヨウ化したヤギ抗ウサギ ＩｇＧ と反応して行なう。

【０１５０】
本発明のタンパク質または生物学的に活性なその断片を、１２５Ｉ ボルトンハンター試薬 （Ｂｏｌｔｏｎ らの （１９７３） Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｊ. １３３：５２９）で標識する。マルチウェルプレートのウェルに予め配置した候補分子を、標識した本発明のタンパク質でインキュベートし、洗浄し、そして標識した本発明のタンパク質複合体を有する全てのウェルをアッセイする。本発明のタンパク質濃度を変えて得たデータを用いて、候補分子との本発明のタンパク質の数、親和性及び会合の値を計算する。本明細書において開示した全ての刊行物および特許を言及することをもって本明細書の一部となす。

【０１５１】
実施例 １０： ヒトの相同遺伝子およびタンパク質の同定
相同タンパク質および核酸分子コーディングは、それゆえ昆虫または各種の脊椎動物、例えば、哺乳動物または鳥から入手可能である。配列に対して相同性を持つニワトリタンパク質および核酸分子は、公的に利用できる全米バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢＩ） の非重複タンパク質データベースのプログラムＢＬＡＳＴＰ ２．２．３を用いて同定した（Ａｌｔｓｃｈｕｌらの、１９９７、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ. ２５：３３８９－３４０２を参照）。

【０１５２】
ニワトリ ＤＰ１１９ （配列番号 ２） は、ヒトＣＡＢ４３２８６．１ （ＡＬ０５０１３７．１ 配列番号 ３によってコードした配列番号 ４） のアミノ酸 ２５１～４３２に対して ９３％ の同一性および ９８％ の相同性を示し、マウスＡＡＨ２５６５４．１ （ＢＣ０２５６５４．１； 配列番号 ６ によってコードした配列番号 ５） のアミノ酸 ５６５～７４６ に対して ９３％ の同一性および９７％ の相同性を示した。ヒトＣＡＢ４

62

３２８６．１ または マウス ＡＡＨ２５６５４．１ をクエリーとして用いた、Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベースでの ＢＬＡＳＴ 検索を行い、次のエントリを明らかにした： 末梢神経系の疾患および免疫系の抑制などが含まれる請求項に記載の用途を有する ＷＯ２００１５３３１２－Ａ１； 自己免疫性／炎症性障害、胃腸および生殖器系の予防および治療に使用される新規炭水化物関連タンパク質を記載する ＷＯ２０００１８９２２－Ａ２； および癌を含んだ生殖器系の障害の予防および治療における用途を有する ＷＯ２００１５５３２０－Ａ２。

【０１５３】
ニワトリ ＤＰ４４４ （配列番号 ７ によってコードされた配列番号 ８ ） は、ヒトＢＩ０３５２９６ （配列番号 ９、図 ４Ｃ） によってコードされたポリペプチドに対して９３％ の同一性および ９７％ の相同性； ヒトＢＦ９５１８１７ （配列番号 １１、図４Ｅ） によってコードされたポリペプチドに対して ９１％ の同一性および ９４％ の相同性； およびヒト ＡＩ２１４４８０．１ （配列番号 １２、図 ４Ｆ） によってコードされたポリペプチドに対して ９２％ の同一性および ９５％ の相同性をそれぞれ示した。
Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベース検索結果は ０ 件であった。

【０１５４】
ニワトリ ＤＰ８１０ （配列番号 １７、図 ６ を参照） は、マウスの多ドメインタンパク質 （ＮＰ＿０７３７２５．１） の ３０８２～３５６６ の アミノ酸に対して５５％の同一性および ６６％ の相同性を示すポリペプチド（配列番号 １８） をコードする。
相同性は、マウスの多ドメインタンパク質 （８４％ の同一性、９４％ の相同性） のアミノ酸 ３３４６～３５６６ に対して特に高くなっている。多ドメインタンパク質のヒトホモログの一部のバージョンは、ＮＰ＿０７８７７６．１ （配列番号 １９ および配列番号 ２０） によってコードする。Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベース検索結果は０ 件であった。

【０１５５】
ニワトリ ＤＰ６８５ （配列番号 ２２、図 ８ を参照） は、ヒトオートタキシン－ｔ（配列番号 ２４） のアミノ酸 １～７３５、アミノ酸 １２５～８６３ 間で、８５％ の同一性および ９２％ の相同性を示した。ヒトオートタキシン－ｔ （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＡＡＢ００８５５．１ および Ｌ４６７２０．１） をクエリーとして用いた Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベースにおける ＢＬＡＳＴ 検索を行い、癌の診断および療法において使用されるオートタキシン運動刺激タンパク質を記載する特許出願番号 ＷＯ ９５／３２２２１ においてアクセッション番号 ＡＡＲ８６５９６ を同定した。

63

【０１５６】
ニワトリWE４７４（配列番号 ２８ をコードする配列番号 ２７ 、図 １０ を参照） は、ヒトコレクチンサブファミリー メンバー １０ （C 型レクチン） アクセッション番号 NM_００６４３８．２（ヌクレオチド） および ＮＰ_００６４２９．１（アミノ酸）、配列番号： ２９ および ３０ に対して ６９% の同一性および ８１% の相同性を示した。ヒトＮＰ_００６４２９．１ を用いた Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベースの検索を行い、血液凝固障害、癌および細胞癒着障害を対象とする特許出願番号 WO９９４６２８１－A2、および広範囲にわたる腫瘍の診断用途を対象とする WO２００１６８８４８－A２ を見出した。

【０１５７】
ニワトリＤＰ１６０（配列番号 ３２、図 １２ を参照）は、アミノ酸 ３～１４０ 間で、ヒトCCR４ 炭素異化代謝産物抑制 ４様 （ＣＣＲＮ４Ｌ） （Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 XM_００３３４３．２） のアミノ酸 ３８６～７９９、 およびヒトCCR４ 炭素異化代謝産物抑制 ４様 （ＣＣＲＮ４Ｌ） （Ｇｅｎｂａｎｋ アクセッション番号 NM_９１２１１８．１） のアミノ酸 ３８６～７９９ に対して ７８% の同一性および ８５% の相同性を示した。ヒトヒトCCR４ 炭素異化代謝産物抑制 ４様 （ＣＣＲＮ４Ｌ） （ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＸＰ_００３３４３．３ およびXM_００３３４３．２） をクエリーとして用いたＤｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベースにおける ＢＬＡＳＴ 検索を行い、癌療法に使用されている特許出願番号 WO WO９９３８９７２－A２ において、ヒト遺伝子発現産物 ｃＤＮＡ 配列番号 ３２６４ を説明するアクセッション番号 ＡＡＺ１５７９５ を同定した。

【０１５８】
ニワトリ ＲＡ９７７ （配列番号 ３５； コードされたタンパク質配列番号 ３６、図 １４ を参照） は、ヒトEMP－２ （ヌクレオチド用の XM_０３０２１８．１； 配列番号 ３７； タンパク質配列用の Ｐ５４８５１； 配列番号 ３８） に対して ７０% の同一性および ８３% の相同性を示した。Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベース検索を行い、癌の診断用途を請求の範囲とする特許出願番号 WO２００１９４６２９－A２、および癌の診断および療法用途を請求の範囲とする特許出願番号 WO２００２２９０８６－A２ が一致することを明らかにした。

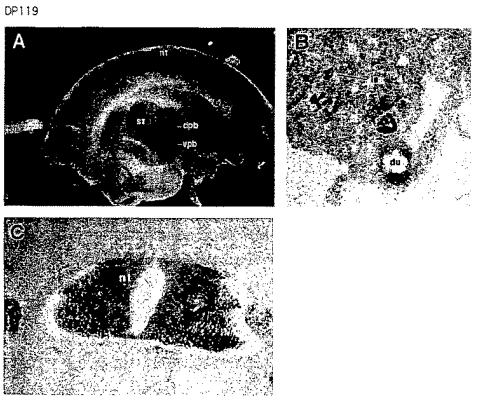
64

【０１５９】
ニワトリ ＲＡ７７０ （配列番号 ４０、図 １６ を参照） は、アミノ酸 ５～９４ 間で、ヒトＮｅｕｒｔｕｒｉｎ 前駆体（配列番号 ４２） の C末端アミノ酸 １０８～１９７ に対して６７% の同一性および ８７% の相同性を示した。ニワトリ ＲＡ７７０ （配列番号 ２） は、アミノ酸 ５～９４ 間で、マウスＮｅｕｒｔｕｒｉｎ 前駆体 （配列番号 ４４） のC末端アミノ酸 １０６～１９５ に対して６４% の同一性および ８４% の相同性を示した。ヒトＮｅｕｒｔｕｒｉｎ 前駆体（ＧｅｎＢａｎｋ アクセッション番号 ＮＰ_００４５４９．１ および NM_００４５５８．１） をクエリーとして用いた Ｄｅｒｗｅｎｔ ＧｅｎＳｅｑ データベースにおける ＢＬＡＳＴ 検索を行い、神経細胞成長を促進するために使用される新しく分離されたｐｅｒｓｅｐｈｉｎ 成長因子を記載している特許出願番号 WO ９９／１４２３５ において配列番号 ７ として開示されているアクセッション番号 ＡＡＹ１６６３７ を同定した。Ｐｅｒｓｅｐｈｉｎ ＧＦ ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、細胞変性または細胞不全の防止または治療に使用することができ、また、例えば、末梢性神経の傷害または損傷、神経毒への暴露、糖尿病のような代謝疾患、または腎機能障害および感染性物質によって引き起こされる被害の治療にも使用できる。加えて、特許出願番号 WO ９７／０８１９６ には、ヒトｐｒｅ－ｐｒｏ－ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ をコードするアクセッション番号 ＡＡＷ１３７１６ が、神経変性疾患および造血細胞変性疾患の治療に使用される新規成長因子Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ として記述されている。また、同タンパク質は、感音難聴の治療のほかに、前庭器の病変および障害の治療にも役立つ新規 Ｎｅｕｒｔｕｒｉｎ 神経栄養因子タンパク質産物として WO９９０６０６４－Ａ１ にも開示されている。

【０１６０】
本発明の方法およびシステムの種々の修正および改変は当業者に当然のことであり、本発明の範囲および精神から逸脱しない限り行い得るものとする。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことは当然のことながら共通認識とする。実際に、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載した本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【図１Ａ】

図 1A. 発育中のニワトリにおける DP119 の発現



【図１Ｂ】

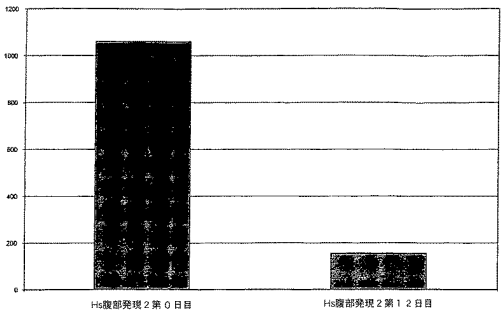


図 1B. ヒト DP110 ホモログの発現。前脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化中のヒト腹部脂肪細胞における DP119発現の定量分析。

【図２Ａ】

図 2: DP119 配列

図 2A: ヒトDKFZp586L151 に対するニワトリ遺伝子相同性の 3’ 末端を含有する核酸配列 (配列識別番号 1)。下線を引いた部分は 3’ -UTR である。

ACGTCGTCTACAACGGGTCCTTCTACTACAACCGGGCCTTCACCCGCAACATCATCAAATACGAC
CTGAAGCAGCGGTACGTGGCCGCCTGGGCCATGCTGCACGACGTGGCCTACGAGGAGTCCACCCC
GTGGCGATGGCGCGGCCATTCCGATGTGGACTTCGCCGTGGACGAGAACGGCCTGTGGGTCATTT
ACCCGGCCATCAGCTACGAGGGCTTCAATCAGGAGGTGATCGTGCTGAGCAAGCTGAACGCAGCC
GACCTCAGCACCCAGAAAGAGACGACGTGGAGGACGGGCCTGCGGAAGAACTTCTATGGGAACTG
CTTCGTCATCTGCGGGGTCCTGTACGCGGTCGACAGCTACAACAAGAGGAACGCCAACATCTCCT
ACGCCTTTGACACGCACACCAACACTCAGATCATCCCCCGGCTGCTCTTTGAGAATGAGTACGCC
TACACCACGCAGATAGACTATAACCCCAAGGACCGCCTGCTCTACGCTTGGGACAATGGCCACCA
GGTCACCTACCACGTCATCTTTGCCTACTGAGCGCCCCGGGATGGGGCACTGCGAGCGAGGGGCC
ACCAGCACCTTTCATTGTTGTTATTTTTATTATTATTATTATTATTTTGTACAAATCAAAGA
GTACGTGATGGGTTTTTGTCTCAGGCTGTTTAGATGGCGGATTGTAGATCGATCCCCAGGCCAGG
ACCACCCTTTGTCCCCGGTGTGACCTTGCCTCTGTGCTCGAGGGCAGTGCGGCGGGGCCCGTGG
CAGCAGGGCTGCTCCTTTGGGGGGACGCTGAGGAGGAGGTGGCCCTGACATAACCCTGCTGATGT
TTTTTTAGATGAAAGCCATCAGCGCTTAACCCCAGGCCCAGTGCAAAGCTGGCCTTTCTGCTGCA
GGCACCGGCTCCTGTGGCAGGACGGTGGTGTCCACCCGTCCCCGTGGAGGGGTGCATTGTCCCCT
CGGGGGGCCACCCTCCCACCCGACAGTCAGCGGGTGCTTGGGAGATCCTGCTGTACAACACGCAC
AGCCCCGGTGCTGGCACTTAGCTGAGGACTGTCCCCTGTCCCCCTGACTCTGCCCTTTGCAGCCT
GCCCTGGGGGCTCCATCTGGCCTGGGGGGGGGCTGTGGGTGCCGGGCTGGGTGCTGGCAGTGGGA
GGGGGGCACTGTAAATATGTGTAGATGACTTCTGTTTGTGCGTTTGTAACCAAAATAGTCCCCA
TTTGGTATCTGCCTCGCGGAGGTCCCAGCCTCCGTCCCTCCAGCCTGGCACCGCCTTGTATTTAC
CCGCTGTTAATAATAAAAGATCAAGTACCTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAA

【図２Ｂ】

図 2B: ニワトリ DP119 のアミノ酸配列 (配列識別番号 2)

VVYNGSFYYNRAFTRNIIKYDLKQRYVAAWAMLHDVAYEESTPWRWRGHSDVDFAVDENGLWVIY
PAISYEGFNQEVIVLSKLNAADLSTQKETTWRTGLRKNFYGNCFVICGVLYAVDSYNKRNANISY
AFDTHTNTQIIPRLLPENEYAYTTQIDYNPKDRLLYAWDNGHQVTYHVIFAY

【図２Ｃ】

図 2C: ヒトDKFZp586L151 (クローン DKFZp586L151 由来) の核酸配列 (配列識別番号3)；部分コドン(GenBank アクセッション番号 AL050137.1)

GTGAGTTTTTCAGCGGTGACAATGGAGTGGATTTGCTGATTGAAGATCAGCTCCTGAGACACAAC
GGCCTGATGACCAGTGTCACCCGGAGGCCTGCAGCCACCCGTCAGGGACACAGCACTGCTGTGAC
CCAGCATCGCCAACCATGCCTCAGTGGGACCAACACTCCAAACAACCTCGGTGTCTCCAGATCCC
ACAAGGGAGTCAGTCCTGCAGCCTTCTCCTCAGGTACCAGCCACCACTGTGGCCCACACAGCCAC
CCAGCAACCAGCAGCCCCAGCTCCTCCGGCAGTGTCTCCCAGGGAGGCATTGATGGAAGCTATGC
ACACAGTCCCAGTGCCTCCCACCACAGTCAGAACAGACTCGCTGGGGAAAGATGCTCCTGCTGGG
CGGGGAACAACCCCTGCCAGCCCCACGCTGAGCCCCGAAGAAGAAGATGACATCCGGAATGTCAT
AGGAAGGTGCAAGGACACTCTCTCCACAATCACGGGGCCGACCACCCAGAACACATATGGGCGGA
ATGAAGGGGCCTGGATGAAGGACCCCCTGGCCAAGGATGAGCGGATTTACGTAACCAACTATTAC
TACGGCAACACCCTGGTAGAGTTCCGGAACCTGGAGAACTTCAAACAAGGTCGCTGGAGCAATTC
CTACAAGCTCCCGTACAGCTGGATCGGCACAGGCCACGTGGTATACAATGGCGCCTTCTACTACA
ATCGCGCCTTCACCCGCAACATCATCAAGTACGACCTGAAGCAGCGCTACGTGGCTGCCTGGGCC
ATGCTGCATGACGTGGCCTACGAGGAGGCCACCCCCTGGCGATGGCAGGGCCACTCAGACGTGGA
CTTTGCTGTGGACGAGAATGGCCTATGGCTCATCTACCCGGCCCTGGACGATGAGGGCTTCAGCC
AGGAGGTCATTGTCCTGAGCAAGCTCAATGCCGCGGACCTGAGCACACAGAAGGAGACCACATGG
CGCACGGGGCTCCGGAGGAATTTCTACGGCAACTGCTTCGTCATCTGTGGGGTGCTGTATGCCGT
GGATAGCTACAACCAGCGGAATGCCAACATCTCCTACGCTTTCGACACCGACACCAACACACAGA
TCGTCCCCAGGCTGCTGTTCGAGAATGAGTATTCCTATACGACCCAGATAGACTACAACCCCAAG
GACCGCCTGCTCTATGCCTGGGACAATGGCCACCAGGTCACTTACCATGTCATCTTTGCCTACTG
ACACCCTTGTCCCCACAAGCAGAAGCACAGAGGGGTCACTAGCACCTTGTGTGTATGTGTGTGCG
TGCACGTGTGTGTAGGTGGGTATGTGTTGTTTAAAAATATATTATTATTTTGTATAATATTGCAAA
TGTAAAATGACAATTTGGGTCTATTTTTTTATATGGATTGTAGATCAATCCATACGTGTATGTGC
TGGTCTCATCCTCCCCAGTTTATATTTTTGTGCAAATGAACTTCTCCTTTTGACCAGTAACCACC
TTCCTTCAAGCCTTCAGCCCCTCCAGCTCCAAGTCTCAGATCTCGACCATTGAAAAGGTTTCTTC
ATCTGGGTCTTGCAGGAGGCAGGCAACACCAGGAGCAGAAATGAAAGAGGCAAGAAAGAAGTGCT
ATGTGGCGAGAAAAAAAGTTTTAATGTATTGGAGAAGTTTAAAAAACCCAGAAAAACGCTTTTT
TTTTTTAATAAAGAAGAAATTAAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図２Ｄ】

図 2D. 仮想タンパク質の (部分的) アミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 CAB43286.1; 配列識別番号 4)

EFFSGDNGVDLLTEDQLLRHNGLMTSVTRRPAATRQGHSTAVTSDLNARTAPWSSALPQPSTSDP
SIANHASVGPTLQTTSVSPDPTRESVLQFSPQVPATTVAHTATQQPAAPAPPAVSPREALMERMH
TVPVPPTTVRTDSLGKDAPAGRGTTPASPTLSPEEEDDIRNVIGRCKDTLSTITGPTTQNTYGRN
EGAWMKDPLAKDERIYVTNYYYGNTLVEFRNLENFKQGRWSNSYKLPYSWIGTGHVVYNGAFYYN
RAFTRNIIKYDLKQRYVAAWAMLHDVAYEEATPWRWQGHSDVDFAVDENGLWLIYPALDDEGFSQ
EVIVLSKLNAADLSTQKETTWRTGLRRNFYGNCFVICGVLYAVDSYNQRNANISYAFDTHTNTQI
VPRLLFENEYSYTTQIDYNPKDRLLYAWDNGHQVTYHVIFAY

【図２Ｅ】

図 2E. DKFZP586L151 タンパク質に類似するハツカネズミの核 酸配列 (GenBank アクセッション番号 BC025654.1; 配列識別番号 5)

CCACGCGTCCGAGTGAAGCCGCCTTCCAGCCTGTCTTTGCTGAGACCTCCGACCCAAGGTGGTCT
CTGTAGGGACTAAAGTCCCTACTGTCGCATCTCTCATGGCCTATCCCCTGCCATTGGTTCTCTGC
TTTGCTCTGGTGGTGGCACAGGTCTGGGGGTCCACTACACCTCCCACAGGGACAAGCGAGCCCCC
TGATGTGCAAACAGTGGAGCCCACGGAAGATGACATTCTGCAAAACGAGGCGGACAACCAGGAGA
ACGTTTATCTCAGCTGCTGGGAGACTATGACAAGGTCAAGGCTGTGTCTGAGGGCTCTGACTGT
CAGTGCAAATGTGTGGTGAGACCGCTGGGCCGAGATGCCTGCCAGAGGATCAACCAGGGGGCTTC
CAGGAAGGAAGACTTCTACACTGTGGAAACCATCACCTCGGGCTCATCCTGTAAATGTGCTTGTG
TTGCTCCTCCGTCTGCCGTCAATCCCTGTGAGGGAGACTTCAGGCTCCAGAGCTTCGGGAGGCT
GACAGCCGAGATTTGAAGCTGTCTACAATTATAGACATGTTGGAAGGTGCTTTCTACGGCCTGGA
CCTCCTAAAGCTGCATTCGGTTACCACTAAACTCGTGGGGCGAGTGGATAAACTGGAGGAGGAAG
TCTCTAAGAACCTCACCAAGGAGAATGAGCAAATCAAAGAGGACGTGGAAGAAATCCGAACGGAG
CTGAACAAGCGAGGCAAGGAGAACTGGTCTGACAACACCCTAGAGAGCATGCCAGACATCCGCTC
AGCCCTGCAGAGGGATGCGGCTGCAGCCTACGCCCACCCAGAGTATGAAGAACGGTTTCTGCAGG
AGGAAACTGTGTCACAGCAGATCAACTCCATCGAACTCCTGAGGACGCAGCCACTGGTCCCTCCT
GCAGCGATGAAGCCGCAGCGGCCCCTGCAGAGACAGGTGCCACCTGAGAGGTCGGCTGGCCTCCAA
GCCCACCGTCATCAGGGGAATCACCTACTATAAAGCCAAGGTCTCTGAGGAGGAAAATGACATAG
AAGAGCAGCACGATGAGCTTTTCAGTGGCGACAGTGGAGTGGACTTGCTGATAGAAGATCAGCTT
CTAAGACAGGAAGACCTACTGACAAGTGCCACCCGGAGGCCAGCAACCACTCGTCACACTGCTGC
TGTCACGACTGATGCGAGCATTCAGGCCGCAGCCTCATCCTCAGAGCCTGCACAGGCCTCTGCCT
CAGCATCCAGCTTTGTTGAGCCTGCTCCTCAGGCCTCCGATAGAGAGCTCTTGGCAACCCCACAG
ACTACCACAGTGTTTCCAGAGCCCACGGGGGTGATGCCTTCTACCCAAGTCTCACCCACCACCGT
GGCCCACACAGCTGTCCAGCCACTTCCAGCAATGGTTCCTGGGGACATATTTGTGGAAGCTCTAC
CCTTGGTCCCTCTGTTACCTGACACAGTTGGGACAGACATGCCAGAGGAAGAGGGGACTGCAGGG
CAGGAAGCAACCTCTGCTGGTCCCATCCTGAGCCCTGAAGAAGAAGATGACATTCGGAATGTGAT
AGGAAGGTGCAAGGACACCCTCTCTACAATCACAGGACCGACCACCCAGAACACATATGGACGGA
ATGAAGGGGCCTGGATGAAGGACCCCCTAGCCAAGGACGACCGCATTTACGTAACCAACTATTAC
TATGGCAACACACTGGTCGAGTTCCGAAACCTGGAGAACTTCAAACAAGGTCGCTGGAGCAATTC
CTACAAGCTTCCATACAGCTGGATCGGCACGGGTCACGTGGTCTACAACGGCGCCTTCTACTATA
ACCGGGCCTTCACCCGAAACATCATCAAGTATGACCTGAAGCAGCGTTATGTGGCTGCCTGGGCC
ATGCTGCACGATGTGGCCTATGAGGAGGCCACTCCTTGGCGGTGGCAGGGTCACTCGGATGTGGA
CTTTGCTGTGGATGAGAATGGCCTGTGGCTTATCTACCCAGCTCTGGATGATGAAGGTTTCAACC
AGGAGGTCATTGTCCTGAGCAAGCTCAATGCCGTGGACCTGAGCACGCAGAAGGAGACCACGTGG
CGCACTGGGCTCCGGAGGAATTTCTATGGCAACTGCTTTGTCATCTGTGGGGTACTATATGCTGT
GGACAGCTATAACCAGAGGAATGCCAACATCTCCTATGCCTTTGACACACACCAACACACAGA
TTGTCCCTAGGCTGCTGTTTGAGAATGAATATTCGTACACCACCCAGATAGACTACAACCCCAAG
GACCGCCTCCTCTATGCCTGGGACAATGGCCACCAGGTCACCTACCATGTCATCTTTGCCTACTG
ACACACTTGACCCTGCAAAAAGAAGCACAGTGGGGCCACTAGCACCTTGTGTGTCTGTGTGCA
TGTCTGTCTGTGAGATTGTGCAGGTGGGTGTGTGTTGTTTAAAATATATTATTTTGTATAATAT
TACAAGTGTAAAATGACAGTTTGGGTCTATTTTTTTTATATGGATTGTAGATCAATCCATATGTG
TATGTGCTGGTCTCATCCTTCACAATTTATATTTTTGTGCAAATGAACTTCTCCTTCTGACCAGT
AACTACCTTCTTTCGTGCTCTGAACCTCTGGCTCCTGAGGTCAAGGGCTGGAGGGTTTCTTCCTC
CAGGTCTTGCAGCCAGGAGCAGGAGTGTGGGGCTCAGGAAAAAGTGCTAAGTGGCGGCAAAGTTT
TTATGTATTAGAGAAGTTCTTAAAACTCAGAAAAAAATACTTTTTTTAAATAAAGGAGATATTTT
AAGACCCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAA

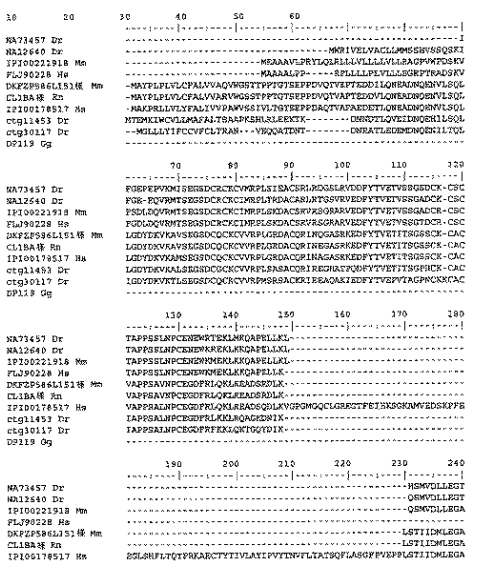
【図２Ｆ】

図 2F. DKFZP586L151 タンパク質に類似するハツカネズミのアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 AAH25654.1; 配列識別番号 6)

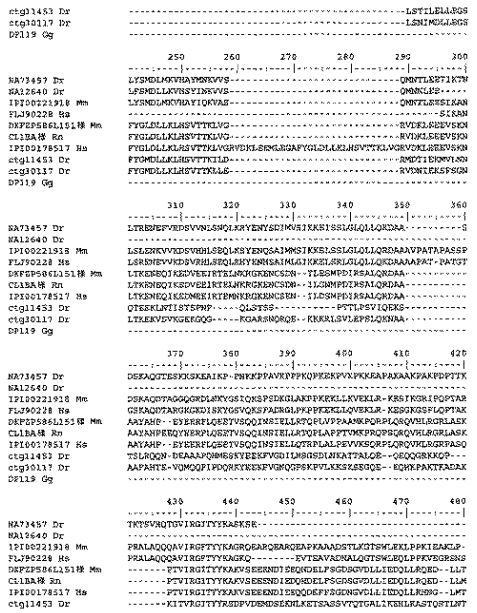
MAYPLPLVLCFALVVAQVWGSTTPPTGTSEPPDVQTVEPTEDDILQNEADNQENVLSQLLGDYDK
VKAVSEGSDCQCKCVVRPLGRDACQRINQGASRKEDFYTVETITSGSSCKCACVAPPSAVNPCEG
DFRLQKLREADSRDLKLSTIIDMLEGAFYGLDLLKLHSVTTKLVGRVDKLEEEVSKNLTKENEQI
KEDVEEIRTELNKRGKENCSDNTLESMPDIRSALQRDAAAAYAHPEYEERFLQEETVSQQINSIE
LLRTQPLVPPAAMKPQRPLQRQVHLRGRLASKPTVIRGITYYKAKVSEEENDIEEQHDELFSGDS
GVDLLIEDQLLRQEDLLTSATRRPATTRHTAAVTTDASIQAAASSSEPAQASASASSFVEPAPQA
SDRELLATPQTTTVFPEPTGVMPSTQVSPTTVAHTAVQPLPAMVPGDIFVEALPLVPLLPDTVGT
DMPSEDGTAGQEATSAGPILSPEEEDDIRNVIGRCKDTLSTITGPTTQNTYGRNEGAWMKDPLAK
DDRIYVTNYYYGNTLVEFRNLENFKQGRWSNSYKLPYSWIGTGHVVYNGAFYYNRAFTRNIIKYD
LKQRYVAAWAMLHDVAYEEATPWRWQGHSDVDFAVDENGLWLIYPALDDEGFNQEVIVLSKLNAV
DLSTQKETTWRTGLRRNFYGNCFVICGVLYAVDSYNQRNANISYAFDTHTNTQIVPRLLFENEYS
YTTQIDYNPKDRLLYAWDNGHQVTYHVIFAY

【図２Ｇ－１】

図 2G. 異なる 種 (Dr, ゼブラフィッシュ; Mm, ハツカネズミ; Hs, ホモサピエンス; Dr, ゼブラダニオ Danio rerio: Gg, ニワトリ) からの DP119 のアライメント

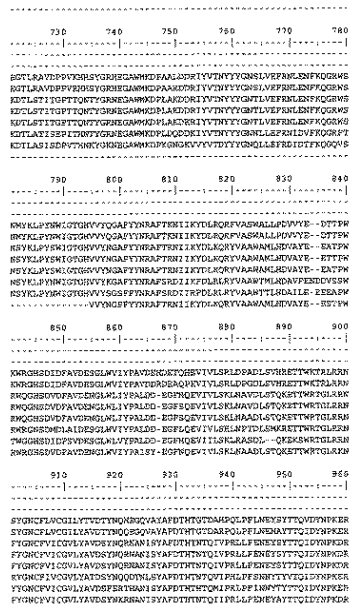


【図２Ｇ－２】

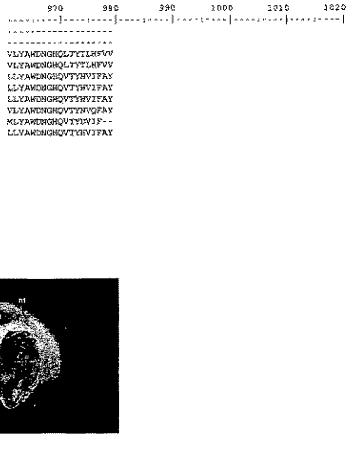


【図２Ｇ－３】

【図２Ｇ－４】

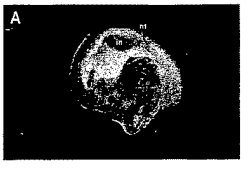


【図２Ｇ－５】

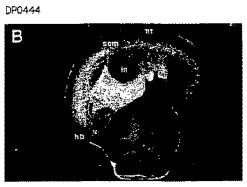


【図３Ａ】

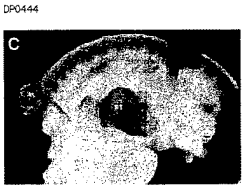
図 3. DP444 の発現



【図３Ｂ】



【図３Ｃ】

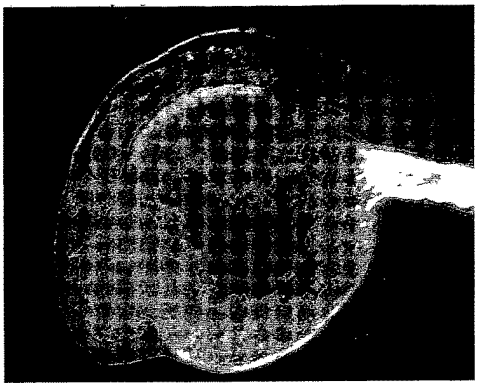


【図３Ｄ】

【図３Ｅａ】

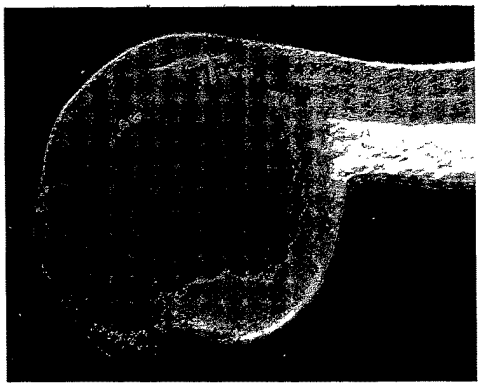
図 3E: ゼブラフィッシュにおける膵島欠損につながる DP444 機能の低下

a) 対照アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した受精後 24 時間の胚



【図３Ｅｂ】

b) DP444 の翻訳をブロックするアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与した受精後 24 時間の胚 (a + b: in-situ (原位置) ハイブリダイゼーション、紫色に染色されたインスリン発現)



【図４Ａ】

図 4: DP444 配列

図 4A: 核酸配列 (配列識別番号 7)。終止コドンは太字で、および 3' UTR には下線を引いてそれぞれ示した。

CCAGGCGTCCGCCCACGCGTCCGGAAAGAGTTTGGTAGAGAACAAGCTTCATGGACTTTCTCCA
GCTCTCTCTGAAGCCATCCAGAGCATTTCTCGCTGGGAACTTGTCCAGGCTGCGCTCCCACATGT
GCTACACTGCACTGCAACATTGCTCTCCAACCGAAACAAGCTAGGTCATCAGGATAAACTTGGAG
TAGCTGAAACAAAGCTTCTTCACACTCTTCACTGGATGCTGTTGGAGGCCCCTCAGGACTGCAGC
AATGACCGATTTGGAGGAGACAGAGGTTCTAGCTGGGGAGGGAGCAGTAGTGCCTTTATCCACCA
GGCTGAAAACCAGGGATCACCGGGACATCCCCGACCCAGCACCACGAATGATGAGGACGAGAACA
ACAGAAGGAAGTTCTTTCAGAACTCCATGGCCACCGTGGAGCTCTTTGTGTTCCTCTTTGCTCCT
CTGGTTCACAGGATTAAAGAATCTGACCTGACGTTTCGATTGGCTAGTGGCCTTGTTATTTGGCA
GCCTATGTGGGAACACAGGCAACCTGAAGTGTCTGCCTTCAATGCCCTCGTAAAACCAATCAGGA
ACATTGTTACAGCTAAAAGAAGTTCTCCTACCAACAATCAGAGTGTGACTTGTGAATCCCTAAAT
CTGGACAGTGGTCATACAGAGGGACTGCAGGTGGTCTGTGAGACGACCCTGCCCGATTCTGTACC
TTCAAAGCCCACTGTTTCAGCATGTCATCGTGGAAATTCCTTGGAAGGAAGCGTGTCCTCTCAAA
CCTCTCAGGAGAGAGGTACTCCACATCCCAGAGTGTCCATGGTGATCCCACCATGCCAGAAGTCT
CGCTATGCCACTTACTTTGATGTGGCAGTACTGCGCTGCTTGCTGCAGCCTCACTGGTCTGAGGA
GGGCACACAGTGGTCACTGATGTATTACCTGCAGAGACTGAGGCATATGCTACAGGAAAAGCCCG
AGAAACCACCTGAGCCAGAGATCACCCTTGCCAAGACTTCGCAGTAGCTCCATGGTGGCTGCT
GCACCCTCTCTGGTCAATACCCACAAAACTCAGGATCTCACAATGAAATGTAATGAGGAAGAAAA
ATCACTAAGCACAGAAGCGTTTTCCAAGGTTTCACTGACCAACTTGCGTAGGCCAGCCGGTTCCAG
ATCTCTCCACAGATCTGGGGATGAACATCTTCAAAAAGTTTAAAAGCCGCAAAGAGGACAGAGAG
CGTGAACGCAAAGGGTCAATTCCTTTCCACCATACTGGGAAGAAGCGTCAACGGAGAATGGGGAT
GCCCTTCCTTCTCCATGAGGACCATTTGGATGTTTCACCCACTCGGAGCACTTTTTCATTTGGCA
GTTTTTCTGGCATTGGAGAGGACCGACGTGGCATTGAGAGAGGAGGATGGCAAACCACCATATTG
GGAAAGTTCACCAGACGGGGGAGCTCTGACACAGCAACGGAGATGGAAAGCCTGAGCGCTAGGCA
CTCACACTCTCACCACACTCTTGTCTCTGATATGCCAGACCACTCAAACAGCCATGGAGAGAACA
CAGTCAAAGAAGTTCGGTCCCAGATCTCTACCATCACTGTGGCCACCTTCAACACTACCCTGGCT
TCGTTCAATGTGGGCTATGCTGATTTCTTCAGTGAGCACATGAGGAAGCTTTGCAATCAGGTGCC
CATCCCTGAGATGCCCCACGAGCCTCTTGCGTGTGCCAACCTCCCACGGAGCCTGACAGACTCAT
GCATCAATTACAGTTGCTTGGAGGATACGGATCACATTGATGCAACCAACAACTTTGTCCACAAG
AACGGCATGCTGGATCTCTCGGTAAATGGCAAGGAATGAGGAAAGCCAGGTCCCTCTTCTGTCAA
TATAGTGGTACCATTGAGATCAGGGTGTTGATGGGCTTTTCCTCCACCTCTTTATATGACTTCTC
TCAGCAGTACATAAAGGTAGTCCTGAAGGCTGTTTACTTGGTCCTGAACCATGACATCAGCTCCA
GGATTGTCATGTGGCACTGAACATTGTGGAGTGCTTGCTTCAGCTTGGAGTGGTGCCATCTGTA
GAGAAAGTCCGGAGGAAGAGCGAGAACAAAGRAAATGAAGCCCCTGAAAAGAGACCAAATGAGGG
ATCTTTTCAACTCAAAGCTTCTGGAGGTTCGGCTTGTGGATTTGGGCCTCCTCCAGTCAGTGGAA
CTGGAGATGGAGGAGAAGAAGGAGGCGGTGGAAGTGGTGGAGGAGGAAGCGATGGAGGTGGTGGA
GGAGGAGGGCCGTATGAGAAGAATGACAAAAAAAAAAAAAAA

【図４Ｂ】

図 4B: DP444 のアミノ酸配列 (配列識別番号 8)

TRPPTRPERVLVENKLHGLSPALSEAIQSISRWELVQAALPHVLNCTATLLSNRNKLGHQDKLGV
AETKLLHTLHWMLLEAPQDCSNDRPGGDRGSWGGSSSAFIHQAENQGSPGHPRPSTTNDEDENN
RRKFFQNSMATVELFVFLPAPLVHRIKESDLTFRLASGLVIWQPMWEHRQFEVSAFNALVKPIRN
IVTAKRSSPTNNQSVTCESLNLDSGHTEGLQVVCETTLPDSVPSKPTVSACHRGNSLEGSVSSQT
SQERGTPHPRVSMVIPPCQKSRYATYFDVARVLRCLLQPHWSEEGTQWSLMYYLQRLRHMLQEKPE
KPPEPEITPLPRLRSSSMVAAAPSLVNTHKTQDLTMKCNEEEKSLSTEAFSKVSLTNLRRPAVPD
LSTDLGMNIFKKFKSRKEDRERERKGSIPFHHTGKKRQRMGMPFLLHEDHLDVSPTRSTFSFGS
FSGIGEDRRGIERGGWQTTILGKPTRRGSSDTATEMESLSARHSHSHHTLVSDMPDHSNSHGENT
VKEVRSQISTITVATFNTTLASFNVGYADFFSEHMRKLCNQVPIPEMPHEPLACANLPRSLTDSC
INYSCLEDTDHIDGTNNFVHKNGMLDLSVNGKE

【図４Ｃ】

図 4C. ヒトホモログ QV2-NN2006-230401-628-d06 NN2006 の核酸配列 (配列識別番号 9、GenBank アクセッション番号 BI035296)

GGAAATTGACCCGGCGAGGCAGTTCAGATGCAGCCACTGAGATGGAGAGTCTGAGCGCCAGGCAT
TCCCACTCCCATCACACCCTGGTAAGCGACCTGCCGGACCCTCCGACAGCCATGGAGAAAACAC
CGTCAAGGAAGTGCCATCTCAGATCTCCACCATCACAGTTGCGACCTTCAATACCACTTTGGCGT
CATTCAACGTAGGCTATGCAGACTTTTTCAATGAGCATATGAGGAAACTCTGCAACCAGGCGCCT
ATCCCGGAGATGCCACATGAACCTCTGGCATGTGCTAACCTACCTGCAAGCCTCACAGACTCCTG
CATAAACTACAGCTACCTAGAGGACACAGAACATATTGACGGGACCAATAACTTTGTC

【図４Ｄ】

図 4D: DP444 のヒトホモログのアミノ酸配列 (配列識別番号 10) (配列識別番号 9 の翻訳)

KLTRRGSSDAATEMESLSARHSHSHHTLVSDLPDPSDSHGENTVKEVRSQISTITVATFNTTLAS
FNVGYADFFNEHMRKLCNQVPIPEMPHEPLACANLPRSLTDSCINYSYLEDTEHIDGTNNFV

【図４Ｅ】

図 4E: GenBank アクセッション番号 BF951817 QV1-NN0228-091100-436-g05 NN0228 ホモサピエンス、配列識別番号 11)

TCGGTACCGGGTCAGTACGGATGTGAGGTCAGATTCCTTGATCCTGGTACCAGTGGAGCAAACAG
AAACACGAAGAGCTCCACAGTAGCCATGGAGTTCTGGAAGATCTTCTTCGGTTGTTCTCTTCTT
CGTCATTAGAGCTGCTTTGGCAAGGCTGCCCTGGAGAACCCTGGTTTTCAACCTGGTGGATGAAA
GCACTGCTGCTTCCACCCCAGCTGGAGCCTCGGTCTGTACCCCAAACCGCTCATTGTTGCAGTC
CTGGGGGGCCTCCAGAAGCATCCAGTGTAGAGTGTGAAGGAGCTTTGTCTCAGCAACACCCAATT
TATCCTGGTGGCCTAGCTTGTTTCGGTTTGAAAGCAGGGTTGCAGTGCAGTGGAGGACATGAGGC
AAAGCAGCTTGCACCAGTTCCCATCCGGAAATGCTCTGGATGGCTTCAGAGAGAGCTGGAGAGAG
GCCATGCAGCTTGTTTCTACCAACACTCGCTCAAAGGACACACAAGAAGCTTCATATTGCTTCC
CCAGTTTGGGCCTCAAAAATGCACTGGTTTGCCGGCACAGGAAGGTCTGGATGGGCAGGGGGATG
CCGCGGGC

【図４Ｆ】

図 4F: GenBank アクセッション番号 AI214480.1; qg69c12.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 ホモサピエンス、(配列識別番号 12)

TGCCCATCCAGACCTTCCTGTGGCGGCAAACCAGTCCTTTGAGCGAGTGTTGGTAGAAAACAAGC
TGCATGGCCTCTCTCCAGCTCTCTCTGAAGCCATCCAGAGCATTTCCAGATGGGAACTGGTGCAA
GCTGCTTTGCCTCATGTCCTCCACTGCACTGCAACCCTGCTTTCAAACCGAAACAAGCTAGGCCA
CCAGGATAAATTGGGTGTTGCTGAGACAAAGCTCCTTCACACTCTACACTGGATGCTTCTGGAGG
CCCCCCAGGACTGCAACAATGAGCGGTTTGGGGGTACAGACCGAGGCTCCAGCTGGGGTGGAAGC
AGCAGTGCTTTCATCCACCAGGTTGAAAACCAGGGTTCTCCAGGGCAGCCTTGCCAAAGCAGCTC
TAATGACGAAGAAGAGAACAACCGAAGA

【図４Ｇ】

図 4G: GenBank アクセッション番号 Hs2_5191_28_4_1 予測 mRNA, (配列識別番号 13)

```
ATGGTGAAGAGGAAGAGCTCCGAGGGCCAGGAGCAGGACGGCGGCCGCGGCATCCCCC7G
CCCATCCAGACCTTCCTGTGGCGGCAAACCAGTTTTTATTATGACGTTACACGCCACCAG
GATAAATTGGGTGTTGCTGAGACAAAGCTCCTTCACACCTCTACACTGGATGCTTCTGGAG
GCCCCCCAGGACTGCAACAATGAGCGGTTTGGGGGTACAGACCGAGGCTCCAGCTGGGGT
GGAAGCAGCAGTGCTTTCATCACCAGGTTGAAAACCAGGGTTCTCCAGGGCAGCCTTGC
CAAAGCAGCTCTAATGCGAGAGAGAAACAACCGAAGAAGATCTTCGAGAACTCCATG
GCTACTGTGGAGCTCTTCGTGTTTCTGTTTGCTCCCCTGGTACACAGGATCAAGGAATCT
GACCTCACCTTCCGTCTGGCCAGTGGGCTGTTATATGGCAGCCATGTGGGACACAGA
CAGCCCGGAGTCTCTGGCTTTACCGCACTGGTGAAGCCCATCAGGAACATCATTACAGCT
AAGAGAAGTTCTCGTATCAACAGTCAAAGCCGGACCTGTGAATCACCAAATCAAGATGCA
AGACACTTAGAGGTACTACTAACCTGGTGCTCTATTTTAGCCTCATGCTTCTATTCAGT
TCACCTCTGTATGATGAATTCTTGATGTGTAACPCTCCTATAGATACTGGGTATGGAGAT
GAAAAAGAAAATRATTAA
```

【図４Ｈ】

図 4H: GenBank アクセッション番号 Hs2_5191_28_4_1 予測タンパク質、(配列識別番号 14)

```
MVKRKSSSGQEQDGGRGIPLPIQTFLWRQTSFTYDCTRHQDKLGVAETKLLHTLHWMLLE
APQDCNNERPGGTDRGSSWGGSSSAFIHQVENQGSPGQPCQSSSNDEEENNRRKIFQNSM
ATVELFVFLFAPLVHRIKESDLTFRLASGLVIWQPMWESRQPGVSGFTALVKPIRNIITA
KRSSFINSQSRTCEEPNQDARHLEVLLTWCFYFSLMLLFSSFLYDEFLMCNSPIDTGYGD
EKENN
```

【図４Ｉ－１】

図 4I: GenBank アクセッション番号 Hs2_5191_28_4_3 予測 mRNA、(配列識別番号15)

```
ATGCTGTGCTGCCCCTCTGAAAGCTTGATTGTCAGTATAATTATCTTCTTTCTGCCATGG
AACAGGGCCTCTCTTGTGATACCTCCGTGCCAAAGGTCCCGCTATGCCACCTACTTTGAC
GTTGCTGTTCTGCCGTGCCTACTTCAGCCCCATTGGTCTGAGGAAGGCACTCAGTGGTCT
CTGATGTACTATCTACAAAGGCTGCGACACATGTTGGAAGAGAAGCCAGAAAAGCCTCCG
GAGCCAGATATTCCTCTCCTGCCCAGACCCAGGAGTAGCTCCATGGTGGCAGCAGCTCCC
TCACTAGTGAACACCCACAAAACCCAAGATCTCACCATGAAGTGTAACGAGGAGGAAAAA
TCTCTTAGCTCTGAGGCCTTTTCCAAGGTTTCACTGACCAATCTGCGTAGATCTGCAGTC
CCAGATCTTTCTTCAGACCTGGGCATGAATATTTTTAAAAAGTTCAAGAGCCGCAAAGAA
GACCGAGAGAGGAAAGGCTCCATTCCATTCCACCACACAGGCAAGAGGAGGCCACGGAGA
ATGGGAGTGCCCTTCCTGCTTCACGAGGACCACCTGGATGTCCCCACGCAGCACA
TTCTCCTTTGGAAGTTCTCTGGGCTGGAGAAGACAGGCGAGGAATTGAGAAAGGAGGC
TGGCAAACCACCATTTTAGGGAAATTGACCCGGCGAGGCAGTTCAGATGCAGCCACTGAG
ATGGAGAGTCTGAGCGCCAGGCATTCCCACTCCCATCACACCCTGGTAAGCGACCTGCCG
GACCCCTCCAACAGCCATGGAGAAAACACCGTCAAGGAAGTGCGATCTCAGATCTCCACC
ATCACAGTTGCGACCTTCAATACCACTTGGCGTCATTCAACGTAGCCTATGCAGCATTT
TTCAATGAGCATATGAGGAAACTCTGCAACCAGGTGCCTATCCCGGAGATGCCACATGAA
CCTCTGGCATGTGCTAACCTACCTCGAAGCCTCACAGACTCCTGCATAAACTACAGCTAC
CTAGAGGACACAGAACATATTGACGGGACCAATAACTTTGTCCACAAGAATCGGAATGCATT
GATCTTTCTGTAGTTCTGAAGGCTGTTTATCTTGTCCTTAATCATGACATCAGCTCTCGT
ATCTGTGACGTGGCGCTAAACATTGTGGAATGCTTGCTTCAACTTGGTGTGGTGCCCTGT
GTAGAAAGAATAGAAGCAGCAGTGAAAACAAGGAAAATGAGACCTTGGAAAAGAGGCCA
AGTGGGGAGCTTTCCAATCAAGGAGTATCTGGAAGTTCCACCTGTGGATTCGGAGGC
CCTGCTGATGAAAGTACACCTGTAAGCAACCATAGGCTTGCTCTACACTAGCTCATCAAA
ATAGTGAAGTCTTTGGGATGTGCCTATGGTTGTGGTGAAGGACACCGAGGGCTCTCTGGA
GATCGCTCGAGACACCAGGTATTCCGAGAGAATGCCCACTAGCTATACCACTTCGCGAGAG
AAGCTAGATAAGATGCAGTTCCGACAAACCATGAGGGACTATGTGAACAAGGACTCTCTC
AATAATGTAGTGGACTTCTTGCATGCTTTGCTAGGATTTTGTATGGAGCCGGTCACTGAC
AACAAGGCTGGGTTTGGAAATAACTTCACCACAGTGGACAACAAATCCACAGCCCAAAAT
GTGGAAGGCATTATCGTCAGCGCCATGTTTAAATCCCTCATCACACGCTGCGCTCCAACC
ACACATGAATTGCACAGCCCTGAGAATCTGGGACTGTATTGTGACATTCGTCAGCTGGTC
CAGTTTATCAAAGAGGCTCATGGGAATGTCTTCAGGAGAGTGGCCCTCAGCGCTCTGCTT
GACAGTGCCGAGAAGTTAGCACCAGGGAAAAAGGTGGAGGAGAATGAACAGGAATCTAAG
CCTGCAGGCAGTAAAACGGATGAACAAATGCAAGGAGCCAACTTGGGCGGAAAGACTTC
TGGCGTAAGATGTTCAAGTCCCAGAGTGCAGCAAGTGACACCAGCAGCCAGTCTGAACAG
GACACTTCAGAATGCACGACTGCCCACTCAGGGACCACCTCTGACCGACGTGCCCGCTCA
```

【図４Ｉ－２】

```
CGATCCCGCAGAATTTCCCTCCGAAAGAAGCTTAAACTCCCCATAGGGAACTGGCTGAAG
AGATCATCCCTCTCAGGCCTGGCAGATGGTGTGGAGGACCTCCTGGACATTAGCTCTGTG
GACCGACTCTCTTTCATCAGCAAAGCTCCAAGGTCAAATTCACTAGTGCTGTGAAGCTT
TCTGAAGGTGGCCCAGGAAGTGGCATGGAAAATGGAAGAGATGAAGAGGAGAATTTCTTC
AAGCGTCTTGGTTGCCACAGTTTGATGATCATCTCTCTCCCAACCAAGATGGTGGAAAA
AGCAAAAACGTGGTGAATCTTGGAGCAATCCGACAAGGCATGAAACGCTTCCAATTTCTG
TTAAACTGCTGTGAGCCAGGGACAATTCCTGATGCCTCCATCCTAGCAGCTGCCTTGGAT
CTAGAAGCCCCTGTGGTGGCCAGAGCAGCCTTGTTCCTGGAATGTGCTCGTTTTGTTCAC
CGCTGCAACCGTGGCAACTGGCCAGAGTGGATGAAAGGGCACCACGTGACATCACCAAG
AAAGGACTTTCCCGGGGACGCTCTCCCATTGTGGGCAACAAGCGAAACCAGAAGCTGCAG
TGGAATGCAGCCAAGCTCTTCTACCAATGGGGAGACGCAATTGGCGTCCGATTGAATGAG
CTGTGCCACGGGGAAAGTGAGAGCCCAGCCAACCTGCTGGGTCTCATTTACGATGAAGAG
ACCAAGAGGAGACTTAGAAAGGAGGATGAGGAGGAAGACTTTTAGATGACAGTAAGGAG
ACTCCCTTTACTACAAGAACCCCCTGCTTGTACTGTGAACCCCTCTAAATGCGGTTGCCCC
TTTGCCTTGAAGATGGCAGCATGTCAGCTTCTTCTGGAGATTACCACCTTCCTGCGAGAG
ACCTTTTCTTGCCTGCCCAGACCTCGCACTGAGCCTCTGGTGGACTTGGAGAGCTGCAGA
CTTCGTTTGGATCCGAGTTGGACCGGCACAGATATGAGAGGAAGATCAGCTTTGCTGGG
GTCCTGGACGAAAATGAAGACTCAAAAGATTCTCTCCACAGCAGCCACACTCTCAAA
TCAGATGCAGGAGTCGAGGAGAAGAAAGTTCCCAGCAGGAAGATCAGGATAGGAGTTCT
CGCCTGCTCCAGATTAAAGGAACCCGCAGTTTCCAGGTGAAGAAGGGGGTTCCTTGTCC
AGCATTCGCCGGGTCGGCAGCTTAAAGAGCAGCAAGTTATCACGGCAGGACTCAGAGTCT
GAGGCTGAGGAGTCGCAGCTCTCCCAGACGAGGGACTCGTCACTGACCTAGAAGGGAGT
CCTTGGAGTGCAAGCGAGCCCAGCATTGAGCCAGAGGGAATGAGTAATGCCGGCGCGGAG
GAGAATTACCACGACAGAAACATGTCGTGGCTTCATGTGATGATCTTGCTGTGCAATCAGCAG
AGTTTCATCTGCACTCACGTTGACTCACTGCCATCCCCACTGCTACCTGCACCACAGCCGC
TCCTGTGCCCGACTGGTCAGAGCCATCAAGCTACTCTATGGAGACAGTGTGGACCTCCCTG
AGGGAAAGCAGCAACATCAGCAGTGTGGCTCTCCGGGGCAAGAAACAGAAGAATGCTCA
GATAAGTCATGCCTGAGGACACCTTCTCTAAAGAAGAGATTTCAGATGCCAATCTGGAA
GGAAAAAAAGATTCCGGAATGCTGAAGTACATCAGACTTCAGGTATTGTTACCTGGATCA
GAAGGATTCATGGAACTTTTAACAGGGAGGGGACTCCAGACAGCCTATTTACTAATGTTT
GGGACATACAACATCAGTTGGTACAGTGTTGGCATAAAGCCCCTTCAGTTGGTGATGAGC
TTGTCGCCTGCTCCCTTATCTCTGTTAATCAAGGCAGCACCAATTCTGACAGAGGAGATG
TACGGAGACATCCAGCCAGCTGCCTGGGAGCTCCTGCTCAGCATGGATGAGCACATGGCA
GGGGCAGCAGTGAAGGTGCCTGAGGCCGTGTCCGACATGCTGATGTCAGAGTTCCACCAC
CCGGAGACTGTGCAGAGGCTGAACGCTGCTCCTCAAGTTCCACACGCTCTGGAGGTTTCGC
TATCAGGTCTGGCCCCGGATGGAGGAAGGGGCACAGCAGATTTTAAGAAATCCTTTCA
GCCCGGGCTGTGTCCCSCTCCCATCAAAGGGCAGAACACATCTTAAAGAACTTGCAGCAG
GAGGAAGAAAAGAAACGACTTGGTAGAGAAGCCAGCCTCATCACTGCCATCCCCATCACC
CAGGAGGCTTGCTATGAGCCCACATSCACGCCCAACTCAGAACCGGAAGAAGAAGTAGAA
GAAGTCACCAATCTGGCAPCCCGTCGACTGTCTGTGAGTCCATCCTGCACCTCCAGCACT
TCCCACAGGAATTATTCCTTCCGCCGCGGGTCAGTCTGGTCAGTGCGTTCAGCCGTCAGT
GCTGAAGATGAGGAACATACCACTGAACACACGCCGAACCACCATGTGCCTCAGCCCCA
```

【図４Ｉ－３】

```
CAAGCAGTGTTCCCAGCATGCATCTGTGCAGCAGTACTTCCCATTGTTCATCTGATGGAG
GATGGTGAGGTGCGGGAAGATGGAGTAGCAGTGAGTGCTGTGGCICAACAAGTCTTATGG
AACTGTCTAATTGAAGATCCATCAACGGTCTTCGACATTTCTGGRAAAACTGACCATC
AGCAATAGACAAGATGAGTTAATGTACATGCTGCGCAAACTTCTCTTGAATATTGGAGAC
TTTCCTGCTCAGACATCTCACATCCTATTCAACTATTTGGTAGGATTAATCATGCTATCTT
GTGCGGACCCCCTGCGAGTGGGGGATGGAIGCCATTTCAGCCACCCTGACATTCCTGTGG
GAGGTGGTGGGTTACGTGGAGGGCCTCTTCTTCAAGGATCTCAAGCAGACGATGAAGAAG
GAGCAGTGTGAGGTGAAGCTCCTGGTGACCGCTTCAATGCCAGGTACIAAAACCTTGGTA
GTTCATGGACAGAATGAGTGCGATATCCCAACCCAGTTACCAGTCCATGAAGACACTCAA
TTTGAAGCCCTGTTGAAGGAGTGTCTGGAGTTTTTAATATCCCAGAATCCCAGTCAACA
CATTATTTTCTTATGGATAAACGATGGAACCTTATCCACTACAATAAGACCTATGTTGA
GATATTTATCCTTTCCGGAGGTCAGTATCCCCAGCCGAATCTGTGTACATATGCATCGA
GAGAGGGACAGGAGCTCATTCAGAAACAGGTGTTCACCCGAAGCTGGAGAAGAGTAGGG
CGGGTGTTGTTTCTCATCTCCCTAACCCAGAAGATCCCCACAGCCCACAAACAGTCCCAC
GTCTCCATGCTTCAGGAAGACCTCCTCCGCCTGCCCTCATTCCCTCGTAGTGCTATTGAT
GCTGAGTTTCACTCTTCAGTGATCCTCAAGCTGGAAAGGAACTCGTTTGGCCTCGACACT
CTTCAGAAAAGCTTGTGGATCCAGCTGCTGGAGGAAATGTTCCTGGGCATGCCGAGCGAG
TTTCCATGGGGAGACGAAATCATGCTTTTCCTCAACGTTTTAACGGGCCTCTGTAPCCTC
CACCCGGAAGACAGTGCCCTGCTCAGGCAGTATGCTGCCACCGTCATCAACACCGCGGTG
CACTTCAACCACCTCTTCTCTCTCAGCGGCTACCAGTGGATTCTCCCCACCATGCTGCAG
GTGTACTCCGACTATGAAAGCAATCCCCAGCTGCGTCAAGCCATCGAATTTGCCTGTCAC
CAGTTCTATATTCTACACCGGAAGCCCTTTGTGCTCCAGCTGTTTGCTAGTGTGGCCCCT
CTCCTGGAATTTCCTGATGCTGCCAATAATGGGCCCAGCAAAGGTGTGTGCAGCTCAGTGC
CTGTTTGACTCGCTGCAGTCCCTAGAGGGAGACACCGACATATTAGACATCTTAGAG
CTGGTCAAAGCTGAGAAGCCTCTCAAGTCATTAGATTTCTGCTATGGAAACGAAGATCTG
ACATTTTCTATCAGTGAAGCCATTAAGCTCTGTGTCACTGTGGTGGCGTATGCTCCCGAA
TCATTCAGAAGTCTTCAGATGCTGATGGTCTTAGAAGCCTTAGTTCCATGTTACCTACAA
AAGCTAAAGAGGCAGACATCACAGGTGGAGACAGTACCTGCTGCCGAGAGGAGATTGCG
GCCACTGCTGCTCTTGCGACGTCCCTACAGGCCTTTTGTACAGTGTAGAGGTCCTCACC
AGGGAAAACCTTCATTACTGGAGGAAGGGCAAGGCATTCCGAGAGAGGAACTGGATGAA
CGAATTGCTCGGGAAGAGTTCAGAAGACCCGGGAGTCCTTACTGAATATTTGCACTGAG
TTCTATAAGCACTGTGGGCCACGGCTGAAGATCTTGCAAAATCTGGCTGGGGAGCCTCGG
GTCATTGCTGGTGACTCCTGATTTCGTTCCTTCCTACAGAGTCGTGCTGGAGGAAGCCTCG
AGAATTACTTCCCTGTGCACTCGTATTTCGTTCCTTCCTACAGAGTCCATTTCACTTGAA
ATTCATGCTAAAGGCCGTATTTGTGTTTCAAAAGGAACGTGA
```

【図４Ｊ】

図 4J: GenBank アクセッション番号 Hs2_5191_28_4_3 予測タンパク質、(配列識別番号 16)

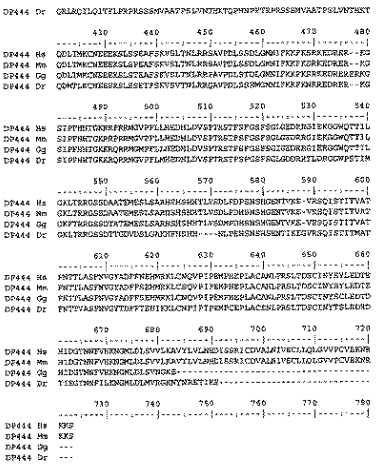
```
MLCCPSESLIVSIIIFFLPWNRASLVIPFCQRSRVATYFDVAVLRCLLQPHWSEEGTQWS
LMYYLQRLRHMLEEKPEKPPEPDIPLLPRPRSSSMVAAAPSLVNTHKTQDLTHKCNEEEK
SLSSEAPSKVSLTNLRRSAVPDLSSDLGMNITFKKFKSRKEDRERKGSIPFHHTGKRRPRR
MGVPFLLHEDHLDVSPTRSTFSFGSFSGLGEDKRGIEKGGWQYTILGKLTRRGSSDAATE
MESLSARHSHSHRTLVSDLPDPSNSHGEPTVKEVRSQISTITVATFNTTLASFNVGYADF
FNEHMRKLCNQVPIPEMPHEPLACANLPRSLTDSCIMYSYLEDTEHIDGTNNFVHKNGML
DLSVVLKAVYLVLNHDISSPICDVALNIVECLLQLGVVPCVEKNRKKSENKENETLEKRP
SEGAPQFKGVSGSSTCGFGGPADESTPVSKHRLALTMLIKTVKSLGCAYGCGEGHRGLSG
DRLRHQVFRENAQNCLTKLYKLDKMQFKQTMRDVNKDGLNNVVDFLHALLGSFCMEPVTD
NKAGFGNNSFTVDNKSTAQNVEGIIVSAMFKSLITRCASTTHDELASPENLGLYCDIRQVV
QFIKEAHGNVFRSVALSALLDSAESKLAPGKKVESENEQESKPASKSESEQNQEANLGPKDF
WRKDMFKSQSAASDTSSQSEQDTSECTTAHSGTTSDRRARRSRSRRISLRKRLKLFIGNWLK
RSSLSGLADGVEDLLDISSVDRLSFIRQSSKVKFTSAVKLSEGGPGSGMENGRDEEENFF
KRLGCHSFDDHLSPNQDGGKSKNVVNLGAIRQGMKRFQFLNCCEPGTIPDASILAAAID
LEAPVVARAALFLECARFVHRCNRGNWPEWMKGHHVNITKKGLSRGRSPIVGNKPNQKLQ
WNAAKLFYQWGDATGVRLNELCRGESESPANLLGLIYDEETKRRLRKEDEEEDFLDDSKE
TPFTTRIPACTVNPSKCGCPFALKMAACQLLLEITTFLRETFSCLPRFRTEPLVDLESCR
LRLDPELDRHRVERKISFAGVLDENEDSKDSLHSSSHTLKSDAGVEEKKVPSRKIRIGGS
RLLQIKGTRSFQVKKGGSLSSIRRVGSLKSSKLSRQDSESSAEELQLSQSRDTVTDLEGS
PWSASEPSIEPEGMSNAGAEENYRRNMSWLHVMILLCNQQSFICTHVDYCPLVLHNSR
SCARLVRAIKLLYGDSVDSLRESSNISSVALRGKKQKECSDKSCLRTPSLKKRVSDANLE
GKKDSGMLKYIRLQVLLPGSEGFMELLTGRGLQTAYLIMFGTYNISWYSVGIKPLQLVMS
LSPAPLSLLIKAARTLTEEMYGDIQPAAWSELLLSMDEHMAGAAVKVPEAVSDMLMSFFHH
PETVQRLNAVLKFNTLWRFRYQVWPRMEEGAQQIFKKSFSARAVSRSHQRAEHILKNLQQ
SEEKKRLGREASLITAIPITQEACYEPTCTPNSEPEEVEEEVTNLASRRLSVSPSCTSST
SHRNYSFRRGSVWSVRSAVSAEDEEHTTEHTPNHHVPQPPQAVFPACICAAVLPIVHLME
DGEVREDGVAVSAVAQQVLWNCLIEDPSTVLRHFLEKLTISNRQDELMYMLRKLLLNIGD
FPAQTSHILFNYLVGLMYFVRSPCEWGMDAISATLIFLWEVVGYVEGLFSKDLKQIQTMNK
EQCEVKLLVTASMPGTKTLVVHGQNECDIFTQLPVHEDTQPRALLKECLPFFNIPESQST
HYFLMDKRWNLINYNKTYVRDIYFFRRSVSPQLNIVHMHPERGQELIQKQVFPRKLESVG
RVLFLISLTQKIPIARHQSNVSMLQEDLRLPSFFRSAIDASFSLFSDPQAGKELFGLDT
LQKSLWIQLLEEMFLGMPSEFFWGDEIMLFLNVFWGALLLHFKDSALLFQVAATVTNIAV
HFNNLFSLSGYQWILPTMLQVYSDYESNPQLRQAIEFACHQFYILHRKFPVLQLFASVAP
LLEFPDAANNGPSKGVSAQQCLFDLIQSLEGETTDIIDILELVKAEKPLKSLDFCYGNEDL
TFSISEAIKLCVTVVAYAPESFRSLQMLMVLEALVPCYLQELKRQTSQVETVPAAREEIA
ATAALATSLQALIYSVEVLTRENLHLLEEGQGIPREELDERIARREEFRRPRESLLNICTE
FYKHCGPRLKILQNLAGEPRVIALELLDVKSHMSVLGKGPRITSLCTRISSSYRDAISLE
IHAKGRICVSKGT
```

【図４Ｋ－１】

図 4K. 他種（DP444 Mm マウス、DP444 Gg ニワトリ、DP444 Dr ゼブラフィッシュ）からの配列を有する DP444 ヒトのアミノ酸配列アライメント

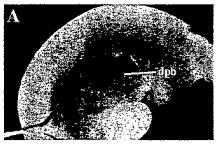
```
                10        20        30        40        50        60
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs MVKRKSSSGQEQDGGRGIPLPIQTFLWRQTSAFLRFKLGKQYEASCVSFERVLVENKLGG
DP444 Mm MVKRKSSSGQEQDGCRGIPLPIQTFLWRQTSAPLRFKLGKQYEASCVSFERVLVENKLGG
DP444 Gg ------------------------------TPPPTRP-----------EKVLVENKLGG
DP444 Dr MVKRKSLDDSGQEKCRGIPPPIQTFLWRQTSAPLRFKLGKQYEASCVSFERVLVENKLGG

                60        70        80        90       100       110       120
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs LSPALSKAIQSTSRWELVQAALPKVLNCTATLLSNRNKLGHQDKLGVAETKLLHTLHWML
DP444 Mm LSPALSKAIQSTSRWELVQAALPKVLNCTATLLSNRNKLGHQDKLGVAETKLLHTLHWML
DP444 Gg LSPALSKAIQSTSRWELVQAALPKVLNCTATLLSNRNKLGHQDKLGVAETKLLHTLHWML
DP444 Dr LSPALTEALQSISRWELVQAALPKVLNCTSILLSNRNKLGHQDKLGVAETKLLHTLHWML

                130       140       150       160       170       180
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs LEAPPDCNNER--PGGTDRGSSWGGSSSAFIHQVENQGSPGQPCQSSSNDEEENNRRKIF
DP444 Mm LEAPQCNNEQ--PGGTDRGSSWGGSSSAFIHQTENQGSPGQPCQSSSNDEEENNRRKTF
DP444 Gg LEAPQCSKGR--PGG-DRGSSWGGSSSAFIHQAENQGSRGHPPSTSTNDEEENNRRKFF
DP444 Dr LEAAQECNQEPGLIHGWEGGS---SGDSSAYLQPMGNQGLTGN--GSTPEETEYAAAELY

                190       200       210       220       230       240
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs QNSMATVELFVFLFAPLVHRIKESDLTFRLASGLVIWQPMWESRQPGVSGFTALVKPIRN
DP444 Mm QNSMATVELFVFLFAPLVHRIKESDLTFRLASGLVIWQPMWKSRQPEVSGFTALVKPIRN
DP444 Gg QNSMATVELFVFLFAPLVHRIKESDLTFRLASGLVIWQPMWSRQPFVSAFNAVKPIRN
DP444 Dr RSNSMATVELFVFLFAPLTNHIKESDLTFRLASGLVIWQPMWEGRQDVPASALSKPLRN

                250       260       270       280       290       300
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs IITAKRSSPINSQSRTCEEPNQDAR-HLEGLQVVCEYTQDGEIK-PKATISGCHEGEEPD
DP444 Mm IITARRSSPINSQSQTCRSPNQDTRQQEGLQVVSEALQSESIS-PKATISGCHQGNSPD
DP444 Gg IVTARRSPTNNQSVTCESLNLDSG-HTGLQVVCEYTLPDSVP-SKPTVSACHVGNSLK
DP444 Dr IITAGRNSQMMPQCSTHDESN-------PCPAVVCESALSDESSSPSMTQGSCRRGNSLE

                310       320       330       340       350       360
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs GSLSSQTSQERGPSNSRASLVIPPCQRSRYATYFDVAVLRCLLQPHWSEGTQWSLMYYL
DP444 Mm GSLSSQTSQERGPSNSRASLVIPPCQRSRYATYFDVAVLRCLLQPHWSEGTQWSLMYYL
DP444 Gg GSVSSQTSQERGTPHPVSWVLPPCQKSRYATYFDVAVLRCLLQPHWSEGTQWSLMYYL
DP444 Dr N-----------------------QRARYATYFDVAVLRCLMQLHWTSEGVHWALIYYL

                370       380       390       400       410       420
                |---------|---------|---------|---------|---------|---------|
DP444 Hs QRLRHMLEEKPEKPP--------EPDIP---------LLPRPRSSSMVAAAPSLVNTHKT
DP444 Mm QRLRHMLEEKPEKTP--------EPDIP---------LLERPRSSSMVAAAPSLVNTHKT
DP444 Gg QRLRHMLQERPEKPP--------EPSIT---------PLERRASSSMVAAAPSLVNTSKT
```

【図４Ｋ－２】



【図５Ａ】

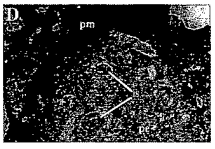
図 5. DP810 の発現



【図５Ｂ】

【図５Ｃ】

【図５Ｄ】



【図６Ａ－１】

図 6: DP810 配列

図 6A: ニワトリの多ドメイン様タンパク質をコードする核酸配列 (配列識別番号 17)。3' 非翻訳領域は下線を引いて示し、終止コドンは太字で示した。

GAATTCGGCACGAGGATCACCCACGTCATAGTACTCGGGGACAACTTCAACTGTGAGCACAAACA
TCACTTTGTCATGTGTAGAAGGCTACACTCTGGTGGGAGCAAGCACATCCACGTGCAAGGAGAGT
GGCGTTTGGATGCCAGAGTTTTCTGATGACATTTGCATTCCTGTGTCATGTGGGATCCCAGAATC
TCCAGAGCACGGATTTGTGGTTGGCACCAAATTCAGTTACAAAGATGTGGTTCTTATAAAATGTG
ATCCTGGCTACGAACTACAAGGTGATACAGAACGGACTTGCCAAGAAGACAAGCTTTGGAGTGGC
TCAGTGCCAACATGCAGAAGAGATATCTTGTGGGCCCCCAGAGGTGATCGAAAATGGATCTGTTCA
AGGAGAAGAGTTCCTGTTTGGCAGCGAGGCTTTTACAGCTGTGACCCTGGTTCGAACTGCAGG
GACCAAGCCGAAGAATTTGCCACGTTGACAAGAAGTGGAGCCCCTCTGCTCCTGTGTGTAGGCGA
ATTACTCGCGGGCTGCCTCCTTCAATAGAAAAAGCAGAGGCCATTTCTACAGGAAACACATACAA
AAGTAATGTAACCTTTGTGTGCAGCTCTGGTTACCACCTTGTTGGACCGCAGAATATCACATGTC
TTGCCAATGGGAGCTGGAGTAAGCCATTACCACTGTGTGAAGAGACCAGATGCAAACTGCCACTT
TCTTTGCTGAATGGGAAGGCAATTTATGAAAATAATACAGTTGGCAGTACTGTAGCATATTTCTG
CAAGAGCGGATACAGTTTGGAAGGAGAACCTACAGCAGAGTGCACGAGGGAGNNNNNNNNNNNN
NTCCTTTGCCTCTCTGTAAACCAAACCCTTGTCCCGTGCTTTCATAATCCCAGAGAATGCCCTT
CTCTCTGAGGTGGATTTTTACGTCGGGCAGAATGTGTCCATCAGGTGCAGGGAAGGCTACCAGTT
GAAAGGGCAGGCTGTGATCACTTGTAATGCTGATGAGACTTGGACTCCAACAACAGCTAATGTGTG
AAAAGATATCTTGCGGGCCCCCAGCTCACATAGAGAATGCTTCTATCCGTGGTAGCTTCTATCAG
TATGGAGATATGATCACCTACTCATGCTACAGTGGTTATATGCTGGAGGGACCCCTGCGGAGCAT
TTGCTTAGAAAATGGAACGTGGACAGACACCACCTACATGCAAAGCTGTCTGTCGTTCCCATGTC
AGAATGGTGGAGTCTGTGAGCGACCAAATGCCTGCTCGTGTCCAGATGGCTGGATGGGTCGTCTC
TGTGAAGAGCCAATATGCATTTTGCCATGTCTCAATGGAGGTCGCTGTGTGGCTCCTTACAAGTG
TGACTGCCCCCCTGGATGGACTGGATCGCGGTCCATACAGCTGTTTGCCAGTCACCTTGCTTAA
ATGGTGGGAAGTGCATACGACCAAATCGATGTTACTGTCCCTCATCATGGACTGGACATGATTGC
TCAAGAAAACGGAAGGCTGGATTCTACCACTTCTAACAGCAGAGCAACAGTTTACACTCAGAAA
CCTTTCTTCAGCCTAGACAGCGGGGCTCAGAATCTAATGCATTGTAAATCACATCCATTGCTTCC
CTTCCCCCACCTCCTTGTTTGTATTTATTTTGTGATATTTTTTCTATACCTTCAATTT
TTAAAGAAAACCTCTGTATTTTCCATTTACAAAAGTATTATCAAATATATGCTGCTATATACACA
CCATACACATACAAAAGTGAAGATCCCTACTGTTCACTGAGAAAGTGGCTGTGTACGGTGAAGTC
CCTCCCATTTCTTACACCCGGTAAGCTAATTAAAACATGCTATACTGCCAGCCATGATTAAACMS
AM:GYKKCMGTTCTGCTTATCATCTGCCAAAGCATACTGAAATCCAGCAACTTAATGGTAAGGAA
TAATTATGTAAAGCTAATTGAACCACCGAACTTTGCATTGGGCTTGTGTCATGGTTGTATAAATT
AGAAGTACATCTGATAAAGTCCCAATTGTAGCCAGAGTTCCTGGTGGACGTAAGTAGATTCTGTA
ATGTTCATTATGTGACATTAACGTCATTGGAAAGCGACTTAGATGGAAGGCAGTGGCAAGAATTT
TAGCCATCAGTAAAATACTCAAAAGCATGAAAGAGTTGAGACAATGTCTAGGCAATAACAGCCTC
TGAGGATTTTTGGCATACAGCATTTCAGGTGTCATGATCAGTCTGGATAATCCAGAATGCAGCA
GCGGACAGCACAGACCACTGAAAACTTCCCCCTGGTAATGGAACTCACCACTACTTGCCTGCAAC

【図６Ａ－２】

CAGTAGCCCTTTCCTGTGTGATGATCAAATACACATCCAACATCCTCCTGCCAGGCAAATGTTTT
TGAGACATGGGGTTTGGGTCCCAATGTTTTGCCCTGCAGTAGGGAGAGAAGGTGAAGCTTTGCT
GTTTGCTTGCAGAAGAGTGGTATTTATGTTATGCTGAACCCTCAGAGAACTGGAAAAGGCCTCTC
TTGTGTACATGCACAGGCAGAAATACCTAGCTGAGTAAGAAATGCTGAGAGCACACATGCTGTCC
GATYTCTCTTTCGCACATTGTTGATCCCAGTGCATCTGAGAGTCACACATGGTTGAGTGCCATCA
TTCAGTTGTGCTCTAATGAGCTGAGATGCTGAGATTTACCGATGGGTACGTGGTGTGGCGGAATT
ACAAGGTGGAAATCCCAGTCATGTGCTGAGGTCAAATGTTTGCTAATTATCATCAGATAGTAATG
AAGTCTAGTCTGTGAAAGAAGATTTAGAGTGAGAACCATTGATCGGGAGCTCCATTTTTCCCAG
TAGCAGCAGAAAAGCATGACTGTCAGCCCACACTAGGAAAGAAGAAGGAAATATGCTCTACACTCT
GCAGCATTACTGCGTAGTTACCCTCGAGGTCATGAGCGTGCACACGCTGCCCCCACCTCCCCCT
TCCCTCTTTATAAATATCATTCCCTTATGAATGCATGATGGACAATAAAGGAGCTNATGGA
GGGACTAGGGCGCTAGTGAAGACTGACACATAGCTAATGGCTGTCAACCCAAGNCCAGAAATGGG
GAACAAACAGTGAAGCTGTGAACCAGGAAAAGCTGGAGAGAAAACAAACAGGTGAAGAATATTT
GTCAAGGGACGAGCTGAATTGGAATGCAGATTCCTTCCCACTGGGAGCTGCAACCGGCTGAGAG
TTGTTCTTTCAACTCCGTAAATATATTTTTCTGATGGATTCTGCTGACATGTACCAACAGCCA
TCAGTGTTTACAGCTTTGGTTCAAGTTAGCATTCAGTAAATAATAACACGTTTCAACCCACGGTC
ACTGCCATGTGTAGGCACTTIGTTCCCTGACTCCTGCTGCTGCACAGTGGGGTGTACAGATGC
TGTAGTGAGCAGCTCGGGATACCTGAAGGGAAAGAGTGCATCAGTGGGAGAAGTGGATTTTATT
TATATGTCATTCTCATCTCTTACAAAGTAGTCCCATTTTCAGTGTGCTTCTCTGGTACGGCCCT
CACAGCCCTGGCAATCTCCAGAGCAGAGCAGCAGTGCTTTGGAAGCGAGCAGGCTGGCAGGAG
ACTGCTGAGCCTTGGGGGCGAGGGCCGGCTTTTAGCACTGCAGCTTCACACTAGTGACTAGTACA
TGGAGTTTGGGGATATACTCAGTCAATACGTTTCATAAGCTGATGTGGTAGAAAGAGTAGCTGAA
ACTATAGGCTGTTATATTAGTGCTGTGTATGATGCTTTGATACTTGCTGGAATATTATCCCTTCC
CCATTCTGTGCGGTATTGTCATTTATGTCACTGCTTGTTGTGTCTTTTAAAGGACTTCTGTCTGA
TGCACTTTACACTGTAAATTAAGTTGCACCCTGTTTAGTACCWAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図６Ｂ】

図 6B: ニワトリ DP810 のアミノ酸配列 (配列識別番号 18).

YSGTTSTVSTNITLSCVEGYTLVGASTSTCKESGVNMPEFSDDICIPVSCGIPESPEHGFVVGTK
FSYKDVVLYKCDPGYELQGDTERTCQEDRLWSGSVPTCRRVSCGPPEVIENGSVQGEEFLFGSEA
FYSCDPGFELQGPSRRICHVDKKWSPSAPVCRRITCGLPPSIEKAEAISTGWTYKSNVTFVCSSG
YHLVGPQNITCLANGSWSKPLPLCEETRCKLPLSLLNGKAIYENNTVGSTVAYFCKSGYSLEGEP
TAECTRNNNNNNPLPLCKPNPCPVPFIIPENALLSEVDFVVGQNVSIRCREGYQLKGQAVITCNA
DETWTPTPAKCEKISCGPPAHIENAFIRGSFYQYGDMITYSCYSGYMLEGPLRSICLENGTWTTP
PTCKAVCRFPCQNGGVCERPNACSCPDGWMGRLCEEPICILPCLNGGRCVAPYKCDCPFGWTSSA
CHTAVCQSPCLNGGKCIRPNRCYCPSSWTGHDCSRKRKAGFYHF

【図６Ｃ】

図 6C: おそらくマウスの多ドメインタンパク質 (POLYDOM) の相同分子種である、マウスの多ドメインタンパク質のアミノ酸 319–866 に対して相同性を持つペプチドをコードする mRNA のホモサピエンスの核配列 (GenBank アクセッション番号 NM_024500.1; 配列識別番号 19).

TATGAATGCACAGCTTGCCCATCGGGGACATACAAACCTGAAGCCTCACCAGGAGGAATCAGCAG
TTGCATTCCATGTTCCCATACAAAATCACACCTCTCCACCTGGAAGCACATCCCCTGAAGACTGTG
TCGCCAGAGAGGGATACAGGGCATCTGGCCAGACCTGTGACTTGTCCACTGCCCTGCCCTGAAG
CCTCCCGAAAATGGTTACTTTATCCAAAACACTTGCAACAACCACTTCAATGCAGCCTGTGGGGT
CCGATGTCACCCTGGATTTGATCTTGTGGGGAGCAGCATCATCTATGTCTACCCAATGGTTTGT
GGTCCGGTTCAGAGAGCTACTGCAGAGTAAGAACATGTCCTCATCTCCGCCAGCCGAAACATGGC
CACATCAGCTGTTCTACAAGGGAAATGTTATATAAGACAACATGTTTGGTTGCCTGTGATGAAGG
GTACAGACTAGAAGGCAGTGATAAGCTTACTTGTCAAGGAAACAGCCAGTGGGATGGGCCAGAAC
CCCGGGTGTGTGGAGCGCCACTGTTCCACCTTTCAGATGCCCAAAGATGTCATCATATCCCCCCAC
AACTGTGGCAAGCAGCCAGCCAAATTTGGGACGATCTGCTATGTAAGTTGCCGCCAAGGGTTCAT
TTTATCTGGAGTCAAAGAAATGCTGAGATGTACCACCTCTGGAAAATGGAATGTCGGAGTTCAGG
CAGCTGTGTGTAAAGACGTGGAGGCTCCTCAAATCAACTGTCCTAAGGACATAGAGGCTAAGACT
CTGGAACAGCAAGATTCTGCCAATGTTACCTGGCAGATTCCAACAGCTAAAGACAACTCTGGTGA
AAAGGTGTCAGTCCGCGTTCATCCAGCTTTCACCCCACGTTACCTTTTCCCAATTGGAGATGTTG
CTATCGTATACACGGCAACTGACCTATCCGGCAACCAGGCCAGCTGCATTTCCATATCAAGGTT
ATTGATGCAGAACCACCTGTCATAGACTGGTGCAGATCTCCACCTCCCGTCCAGGTCTCGGAGAA
GGTACATGCCGCAAGCTGGGATGAGCCTCAGTTCTCAGACAACTCAGGGGCTGAATTGGTCATTA
CCAGAAGTCATACACAAGGAGACCTTTTCCCTCAAGGGGAGACTATAGTACAGTATACAGCCACT
GACCCCTCAGGCAATAACAGGACATGTGATATCCATATTGTCATAAAAGGTCTCCCCTGTGAAAT
CCCATTCACACCTGTAAATGGGGATTTTATATGCACTCCAGATAATACTGGAGTCAACTGTACAT
TAACTTGCTTGGAGGGCTATGATTTCACAGAAGGGTCTACTGACAAGTATTATTGTGCTTATGAA
GATGGCGTCTGGAAACCAACATATACCACTGAATGGCCAGACTGTGCCAAAAAACGTTTTGCAA
CCACGGGTTCAAGTCCTTTGAAGTGTTCTACAAAGCAGCTCGTTGTGATGACACAGATCTGATGA
AGAAGTTTTCTGAAGCATTGGAGACGACCCTGGAAAAATGGTCCCATCATTTTGTAGTGATGCA
GAGGACATTGACTGCAGACTGGAGGAGAACCTGACCAAAAAATATTGCCTAGAATATAATTATGA
CTATGAAAATGGCTTTGCAATTGGTAATTAAATTCTGTGGCATCGGTAGTTGGCAAGACTAATCT
GCAAAATAAGAATAATTCCAGAAAAGTGAGGCAAACTAGAAACATTAACTTCTATTATTTATTC
ACCAAGTATTTTAGGATGGCTAAATAATTTGATAATGTGCTGAAAGATCATTAAGGTTATATCAA
ATTTTAGTAACAAATAAATTATTTAAAATTATTTGCCAGGATTCTTAAAAATGACAAAAACTAAG
AAAACTAAGTCACATATGCTGGTAAAATTCAAATGTTGATGTATCCTAAAAGAGAATAGTAATAA
AGTCCTAACAGCAACTTTT

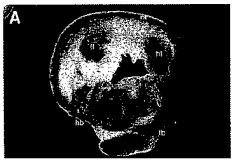
【図６Ｄ】

図 6D. おそらくマウスの多ドメインタンパク質の相同分子種であるヒトのアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 NP_078776.1; 配列識別番号 20)

MLYKPTCLVACDEGYRLEGSDKLTCQGNGQWDGPEPRCVERHCSTFQMPKDVIISFHNCGKQFAK
FGTICYVSCRQGFILSGVKEMLRCTPSGKWNVGVQAAVCKDVEAPQINCPKDIPAKTLEQQDSAN
VTWQIFTAKDNSGEKVSVEWHPAFTPEYLSFQGDVRVIVTATDLSGNQASCIFHIKVIDAEPPVI
DWCRSPPVQVEEKVMAASWDEPQKFDNSGAELVITRSHTQGDLFPQGETIVQYTATDPSGNSRT
CDIHIVIKGSPCEIPFTPVNGGFICTPDNTGVNCTLTCLEGYDFTEGSTDKYYCAYEDGVWKPTY
TTEWPDCAKKRPANHGFKSFSFMFYKAARCDDTDLMKKFSEALETTLGKMVPSPCSDAEDIDCRLE
ENLTKKYCLEYNYDYENGFAIGN

【図７Ａ】

DP685



DP685/autotaxin (オートタキシン) の発現

A. 受精後 4 日目のニワトリ胚および DP685 プローブを用いたホールマウント in-situ ハイブリダイゼーション。
背側神経 (nt)、背側前脳 (fb) および菱脳 (hb)、鰓弓 (ba) および 発育中の後肢 (hl) および 前肢 (fl) の前部に発現が観察される。

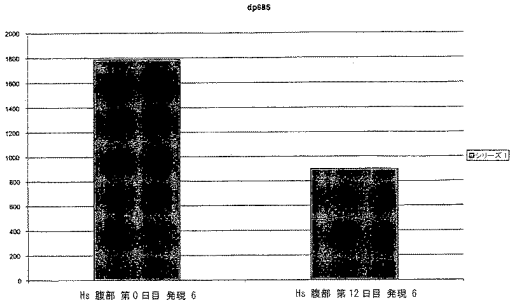
【図７Ｂ】

DP685

B. 受精後 5 日目のニワトリ胚および DP685 プローブを用いたホールマウント in situ ハイブリダイゼーション。
発育中の胃腸 (st) および背側膵芽 (dpb) に発現 が観察される。

【図７Ｃ】

図 7C. ヒト DP685 ホモログの発現。前脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化中のヒト腹部脂肪細胞における DP685 発現の定量分析。



【図８Ａ】

図 8: DP685 配列

図 8A: ニワトリの DP685 様タンパク質をコードする核酸配列 (配列識別番号 21)。

CTTAAGTAGAGGAGACTGTTGCACTAATTACCAGGTCGTTTGCAAAGGAGAAACCCACTGGGTCG
ATGATGACTGTGAAGAGATAAAAACTCCTGAATGTCCAGCAGGCTTTGTTCGTCCTCCTTTGATC
ATCTTCTCTGTTGATGGTTTCCGTGCATCATATATGAAGAAAGGGAACAAGGTCATGCCCAATAT
TGAAAAGCTGAGATCTTGTGGAACACATTCTCCTTACATGAGGCCGGTCTACCCTACAAAAACCT
TCCCCAACTTGTACACCCTTGCTACTGGACTCTATCCTGAATCACATGGAATCGTTGGCAATTCA
ATGTATGACCCAGTGTTTGATGCCAGCTTCAGTCPTCGAGGGCGAGAGAATTCAATCACAGATG
GTGGGGAGGTCAACCAATTTGGATTACTGCAGCCAAGCAAGGGGTGAAAGCTGGCACATTCCTCT
GGTCTGTTGTCATCCCCCACGAGCGTAGAATACTAACAATACTGCAGTGGCTGACCCTTCCGGAT
AACGAAGGCCTTATGTTTATGCTTTCTACTCTGAGCAACCAGATGCTGCTGGCCACAGATATGG
TCCTTCAACTCAGAGATGATGGTAAATCCCCTGAGAGAGATTGACAAGACAGTAGGACAACTAA
TGGATGGACTGAAACAGCTGAAACTGCATCGATGTGTCAATGTCATATTTGTTGGTGATCATGGG
ATGGAAGATACTACTTGTGAAAGAACTGAATTTTTGAGCAACTACCTGACCAACGTGGAAGATAT
CATTCTGCTGCCTGGATCTTTAGGGAGAATCTGCCCTAGGTCTAGCAATAACCTGAAATATGACC
CCAAAGTGATTGTTGCCAACCTTACATGCAGGAAGCCAGACCAGCACTTTAAGCCATACTTGAAG
CATCACCTTTCTAAACGCTTGCACTATGCTTACAATAGGCGAATTGAGGATGTCCATTTACTGGT
TGAGCGCAAGTGGCATGTAGCAAGGAAAGCTGTGGATGTTTACAAGAAACCAACAGGAAAGTGTT
TCTTCCATGGAGACCATGGCTATGACAACAAGATAAACAGCATGCAGACTGTCTTCATAGGTTAT
GGACCTACATTCAAATACAAGACCAAAGTACCGCCTTTTGAAAACATTGAACTTTACAATGTCAT
GTGTGATCTGCTTGGATTAAAGCCTGCTCCCAATAATGGTACCCACGGAAGTTTGAATCACCTGC
TAAGAGCCAATGTTTATAAACCAACTGTGCCAGATGAAGTTGCTAAGCCACTTTATCCTGTAGCA
CTACCTTCTGCATCAGATTTGATATAGGATGTACATGTGATGATAAGAACAAGTTGGATGAACT
CAACAAGCGCTTTCATGTCAAGGGAACGGAAGAGAAGCATCTTCTGTACGGGCGCCCTGCAGTGC
TGTACCGCACGAAGTACAATATCTTGCACCACCATGACTTTGAAAGTGGCTACAGTGAAACATTC
CTGATGCCTCTCTGGACATCCTACACTATTTCCAAACAGGCAGAGGTATCCGGTGTCCCAGAACA
CCTGGCCAGCTGCGTCAGGCCCGATCTCCGCATATCTCCAGGAAACAGCCAGAGCTGCTCAGCCT
ACAGAGGTGACAAGCAGCTCTCCTACAGCTTCCTCTTCCCTCCTCAACTAAGTTCCTCTGCAGAA
GCAAAGTATGATGCTTTTCTAATAACAAATATCATTCCAATGTATCCTGCTTTCAAAAAGGTATG
GAACTATTTCCAAAGGGTTTTAGTGAAGAGATATGCCACTGAACGAAATGGAGTCAATGTTATAA
GTGGACCAATCTTTGACTATGACTATGATGGTTTACATGACACACCTGAAAAAATCAAACAGTTT
GTGGAAGGCAGTGCCATCCCTGTTCCTACTCATTACTATGCCATCATAACCAGCTGTTTAGATTT
CACTCAGCCAGCCGACAAGTGTGATGGACCACTCTCTGTTCTCTCGTACATCCTTCCCCACCGGC
CTGACAACGATGAGAGCTGCAATAGCATGGAAGATGAATCAAAGTGGGTTGAAGATCTTCTTAAG
ATGCACACTGCACGGGTGCGGGACATTGAGCAGCTCACAAGCTTGGACTTCTTCCGAAAGACGAG
TCGCAGCTACACAGAAATCCTCTCCCTAAAGACATACCTGCATACATTTGAAAGTGAAATTTAGC
TTTCTAACCTTGCTCAGTGCATTCTTTTATCAACTGGTGTATAATTTTATATTGGTTTTATATTT
ATTAATTTGAAACCAGGACATTAAAAATATTAGTATTTTAATCTTGTATCAAATCTTAAATATTA
AACCCTTGTGTCATTTGTTTTGTTCTCTAATGTTTAATATAGGTATGTCTCTTGGTTTATTTAG
TAGCGCTTGTAATACTGCAGCTTAAGTCCTTACTCCAAGCTTTTATCTGGTGCTGCAGAATTTGA
TACGTGATTCGAGGAAATATTAATTTCCCATGCTCCTTTACCACACTTTAGTCCTGTACTGTGT
ATCAAAATACTGAACATGTAAAATTACATTCATTTACTGTTGACTATGTGACAGACATATTTAAA
CCCTATAGACAAATAGCATCTTAAATATAATAAACCACACATTCAGTTTTNAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図８Ｂ】

図 8B: ニワトリ DP685 のアミノ酸配列 (配列識別番号 22)。

LSRGDCCTNYQVVCKGETHWVDDDCEEIKTFECPAGFVRPPLIIFSVDGFRASYMKKGNKVMPNI
EKLRSCGTHSPYMRPVYPTKTFPNLYTLATGLYPESHGIVGNSMYDPVFDASFSLRGREKFNHRW
WGGQPIWITAAKQGVKAGTFFWSVVIPHERRILTILQWLTLPDNERPYVYAFYSEQPDAAGHRYG
PFNSEMMVNFLRELDKTVGQLMDGLKQLKLHRCVNVIFVGDHGMEDVTCERTEFLSNYLTNVEDI
ILLPGSLGRISPRSSNNLKYDPKVIVANLTCRKPDQHFKPYLKHHLSKRLHYAYNRRIEDVHLLV
ERKWHVARKAVDVYKKPTGKCFFHGDHGYDNKINSMQTVFIGYGPTFKYKTKVPPFENIELYNVM
CDLLGLKPAPNNGTHGSLNHLLRANVYKPTVPDEVAKPLYPVALPSASDFDIGCTCDDKNKLDEL
NKRFHVKGTEEKHLLYGRPAVLYRTKYNILHHHDFESGYSETFLMPLWTSYTISKQAEVSGVPEH
LASCVRPDLRISPGNSQSCSAYRGDKQLSYSFLFPPQLSSSAEAKYDAFLITNIIPMYPAFKKVW
NYFQRVLVKAYAFERNGVNVISGPIFDYDYDGLHDTPEKIKQFVEGSAIPVPTHYYAIITSCLDF
TQPADKCDGPLSVLSYILPHRPDNDESCNSMEDESKWVEDLLKMHTARVRDIEQLFSLDEFRKTS
RSYTEILSLKTYLHTFESEI

【図８Ｃ】

図 8C: ホモサピエンス オートタキシン -t (atx-t) 遺伝子の核配列
(GenBank アクセッション番号 L46720.1、配列識別番号 23).

AGTGCACTCCGTGAAGGCAAAGAGAACACGCTGCAAAAGGCTTTCCAATAATCCTCGACATGGCA
AGGAGGAGCTCGTTCCAGTCGTGTCAGATAATATCCCTGTTCACTTTTGCCGTTGGAGTCAATAT
CTGCTTAGGATTCACTGCACATCGAATTAAGAGAGCAGAAGGATGGGAGGAAGGTCCTCCTACAG
TGCTATCAGACTCCCCCTGGACCAACATCTCCGGATCTTGCAAGGGCAGGTGCTTTGAACTTCAA
GAGGCTGGACCTCCTGATTGTCGCTGTGACAACTTGTGTAAGAGCTATACCAGTTGCTGCCATGA
CTTTGATGAGCTGTGTTTGAAGACAGCCCGTGCGTGGGAGTGTACTAAGGACAGATGTGGGGAAG
TCAGAAATGAAGAAAATGCCTGTCACTGCTCAGAGGACTGCTTGGCCAGGGGAGACTGCTGTACC
AATTACCAAGTGGTTTGCAAAGGAGAGTCGCATTGGGTTGATGATGACTGTGAGGAAATAAAGGC
CGCAGAATGCCCTGCAGGGTTTGTTCGCCCTCCATTAATCATCTTCTCCGTGGATGGCTTCCGTG
CATCATACATGAAGAAAGGCAGCAAAGTCATGCCTAATATTGAAAAACTAAGGTCTTGTGGCACA
CACTCTCCCTACATGAGGCCGGTGTACCCAACTAAAACCTTTCCTAACTTATACACTTTGGCCAC
TGGGCTATATCCAGAATCACATGGAATTGTTGGCAATTCAATGTATGATCCTGTATTTGATGCCA
CTTTTCATCTGCGAGGGCCGAGAGAAATTTAATCATAGATGGTGGGGAGGTCAACCGCTATGGATT
ACAGCCACCAAGCAAGGGGTGAAAGCTGGAACATTCTTTTGGTCTGTTGTCATCCCTCACGAGCG
GAGAATATTAACCATATTGCAGTGGCTCACCCTGCCAGATCATGAGAGGCCTTCGGTCTATGCCT
TCTATTCTGAGCAACCTGATTTCTCTGGACACAAATATGGCCCTTTCGGCCCTGAGATGACAAAT
GCTCTGAGGGAAATCGACAAAATTGTGGGGCAATTAATGGATGGACTGAAACAACTAAAACTGCA
TCGGTGTGTCAACGTCATCTTTGTCGGAGACCATGGAATGGAAGATGTCACATGTGATAGAACTG
AGTTCTTGAGTAATTACCTAACTAATGTGGATGATATTACTTTAGTGCCTGGAACTCTAGGAAGA
ATTCGATCCAAATTTAGCAACAATGCTAAATATGACCCGAAGCCATTATTGCCAATCTCACGTG
TAAAAAACCAGATCAGCACTTTAAGCCTTACTTGAAACAGCACCTTCCCAAACGTTTGCACTATG
CCAACAACAGAAGAATTGAGGATATCCATTTATTGGTGGAACGCAGATGGCATGTTGCAAGGAAA
CCTTTGGATGTTTATAAGAAACCATCAGGAAAATGCTTTTTCCAGGGAGACCACGGATTTGATAA
CAAGGTCAACAGCATGCAGACTGTTTTTGTAGGTTATGGCCCAACATTTAAGTACAAGACTAAAG
TGCCTCCATTTGAAAACATTGAACTTTACAATGTTATGTGTGATCTCCTGGGATTGAAGCCAGCT
CCTAATAATGGGACCCATGGAAGTTTGAATCATCTCCTGCGCACTAATACCTTCAGGCCAACCAT
GCCAGAGGAAGTTACCAGACCCAATTATCCAGGGATTATGTACCTTCAGTCTGATTTTGACCTGG
GCTGCACTTGTGATGATAAGGTAGAGCCAAAGAACAAGTTGGATGAACTCAACAAACGGCTTCAT
ACAAAAGGGTCTACAGAAGAGAGACACCTCCTCTATGGGCGACCTGCAGTGCTTTATCGGACTAG
ATATGATATCTTATATCACACTGACTTTGAAAGTGGTTATAGTGAAATATTCCTAATGCCACTCT
GGACATCATATACTGTTTCCAAACAGGCTGAGGTTCCAGCGTTCCTGACCATCTGACCAGTTGC
GTCCGGCCTGATGTCCGTGTTTCTCCGAGTTTCAGTCAGAACTGTTTGGCCTACAAAAATGATAA
GCAGATGTCCTACGGATTCCTCTTTCCTCCTTATCTGAGCTCTTCACCAGAGGCTAAATATGATG
CATTCCTTGTAACCAATATGGTTCCAATGTATCCTGCTTTCAAACGGGTCTGGAATTATTTCCAA
AGGGTATTGGTGAAGAAATATGCTTCGGAAAGAAATGGAGTTAACGTGATAAGTGGACCAATCTT
CGACTATGACTATGATGGCTTACATGACACAGAAGACAAAATAAAACAGTACGTGGAAGGCAGTT
CCATTCCTGTCCAACTCACTACTACAGCATCATCACCAGCTGTCTGGATTTCACTCAGCCTGCC
GACAAGTGTGACGGCCCTCTCTCTGTGTCCTCCTTCATCCTGCCTCACCGGCCTGACAACGAGGA
GAGCTGCAATAGCTCAGAGGACGAATCAAAATGGGTAGAAGAACTCATGAAGATGCACACAGCTA
GGGTGCGTGACATTGAACATCTCACCAGCCTGGACTTCTTCCGAAAGACCAGCCGCAGCTACCCA
GAAATCCTGACACTCAAGACATACCTGCATACATATGAGAGCGAGATTTAACTTTCTGAGCATCT
GCAGTACAGTCTTATCAACTGGTTGTATATTTTATATTGTTTTPGTATTTATTAATTTGAAACC
AGGACATTAAAAATGTTAGTATTTTAATCCTGTACCAAATCTGACATATTATGCCTGAATGACTC
CACTGTTTTTCTCTAATGCTTGATTTAGGTAGCCTTGTGTTCTGAGTAGAGCTTGTAATAAATAC
TGCAGCTTGAGTTTTAGTGGAAGCTTCTAAATGGTGCTGCAGATTTGATATTTGCATTGAGGAA
ATATTAATTTTCCAATGCACAGTTGCCACATTTAGTCCTGTACTGTATGGAAACACTGATTTTGT
AAAGTTGCCTTTATTTGCTGTTAACTGTTAACTATGACAGATATATTTAAGCCTTATAAACCAAT
CTTAAACATAATAAATCACACATTCAGTTTTTTCTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図８Ｄ】

図 8D. ヒト オートタキシン -t のアミノ酸配列
(GenBank アクセッション番号 AAB00855.1; 配列識別番号 24)

MARRSSFQSCQIISLFTFAVGVNICLGFTAHRIKRAEGWEEGPPTVLSDSPWTNISGSCKGRCFE
LQEAGPPDCRCDNLCKSYTSCCHDFDELCLKTARAWECTKDRCGEVRNEENACHCSEDCLARGDC
CTNYQVVCKGESHWVDDDCEEIKAAECPAGFVRPPLIIFSVDGFRASYMKKGSKVMPNIEKLRSC
GTHSPYMRFVYPTKTFPNLYTLATGLYPESHGIVGNSMYDPVFDATFHLRGREKFNHRWWGGQPL
WITATKQGVKAGTFFWSVVIPHERRILTILQWLTLPDHERPSVYAFYSEQPDFSGHKYGPFGPEM
TNPLREIDKIVGQLMDGLKQLKLHRCVNVIFVGDHGMEDVTCDRTEFLSNYLTNVDDITLVPGTL
GRIRSKFSNNAKYDPKAIIANLTCKKPDQHFKPYLKQHLPKRLHYANNRRIEDIHLLVERRWHVA
RKPLDVYKKPSGKCFFQGDHGFDNKVNSMQTVFVGYGPTFKYKTKVPPFENIELYNVMCDLLGLK
PAPNNGTHGSLNHLLRTNTFRPTPMPEEVTRPNYPGIMYLQSDFDLGCTCDDKVEPKNKLDELNKR
LHTKGSTEERHLLYGRPAVLYRTRYDILYHTDFESGYSEIFLMPLWTSYTVSKQAEVSSVPDHLT
SCVRPDVRVSPSFSQNCLAYKNDKQMSYGFLFPPYLSSSPEAKYDAFLVTNMVPMYPAFKRVWNY
FQRVLVKKYASERNGVNVISGPIFDYDYDGLHDTEDKIKQYVEGSSIPVPTHYYSIITSCLDFTQ
PADKCDGPLSVSSFILPHRPDNEESCNSSEDESKWVEELMKMHTARVRDIEHLTSLDFFRKTSRS
YPEILTLKTYLHTYESEI

【図８Ｅ】

図 8E: ハツカネズミ、 細胞外ヌクレオチドピロホスファターゼ / ホスホジエステラーゼ 2、 クローン MGC:6665 の核配列 (GenBank アクセッション番号 BC003264.1; 配列識別番号 25).

CCCACGCGTCCGCCCACGCGTCCGGAGAACACCCTGCAGAGGTTTTCCAAGAATCCCTCGGCATG
GCAAGACAAGGCTGTTTCGGGTCATACCAGGTAATATCCTTGTTCACTTTTGCCATCGGCGTCAA
TCTCTGCTTAGGATTCACAGCAAGTCGAATTAAGAGGGCCGAATGGGATGAAGGACCTCCCCACAG
TGTTATCTGACTCTCCATGGACCAACACATCTGGATCCTGCAAAGGTAGATGCTTTGAGCTTCAA
GAGGTTGGACCTCCTGACTGTCGGTGTGACAACCTATGTAAGAGCTACAGCAGCTGCTGCCATGA
TTTTGATGAGCTCTGTTTGAAAACAGCTCGAGGCTGGGAGTGCACCAAAGACAGATGTGGGGAAG
TACGAAATGAGGAAAATGCCTGTCACTGCTCAGAAGACTGCTTGTCCCGGGGAGACTGCTGTACC
AACTATCAAGTGGTCTGCAAAGGAGAATCACACTGGGTAGATGATGACTGTGAAGAAATAAGAGT
CCCTGAATGCCCTGCAGGGTTTGTCCGCCCTCCGTTAATCATCTTCTCTGTGGATGGATTCCGTG
CATCGTACATGAAGAAGGCAGCAAGGTTATGCCCAACATTGAGAAACTGCGGTCCTGTGGCACC
CATGCTCCCTACATGAGGCCTGTGTACCCTACAAAAACCTTCCCTAATCTGTATACGCTGGCCAC
TGGTTTATATCCAGAATCCCATGGAATCGTTGGCAATTCAATGTATGACCCTGTCTTTGATGCTA
CTTTCCATCTTCGAGGGCGAGAGAAGTTAACCATAGATGGTGGGGAGGCCAACCGCTATGGATT
ACAGCCACCAACGAAGGGGTGAGAGCCGGGACATTCTTTTGGTCTGTGAGCATCCCTCACGAGCG
GAGAATCCTAACTATCCTTCAGTGGCTTCCCTGCCAGACAATGAGAGGCCTTCAGTTTATGCCT
TCTACTCCGAGCAGCCTGATTTTTCTGGACACAAGTACGGCCCTTTTGGCCCTGAGATGACAAAT
CCTCTGAGGGAGATTGACAAGACCGTGGGGCAGTTAATGGACGGACTGAAACAACTCAAGCTGCA
CCGTTGTGTGAATGTTATCTTTGTTGGAGACCATGGAATGGAAGACGTGACATGTGACAGAACTG
AGTTCTTGAGCAACTATCTGACTAACGTGGATGATATTACTTTAGTACCTGGAACTCTAGGAAGA
ATTCGACCCAAGATTCCCAATAATCTTAAATATGACCCTAAAGCCATTATTGCTAACCTCACGTG
TAAAAAACCAGATCAGCACTTTAAGCCTTACATGAAACAGCACCTTCCCAAACGTTTGCACTATG
CCAACAATCGGAGAATCGAGGATCTCCATTTATTGGTGGAACGCAGATGGCATGTTGCAAGGAAA
CCTTTGGACGTTTATAAGAAGCCGTCAGGAAAATGTTTTTTCCAGGGTGACCACGGCTTTGATAA
CAAGGTCAATAGCATGCAGACTGTTTTTGTAGGTTATGGCCCAACTTTTAAGTACAGGACTAAAG
TGCCTCCATTTGAAAACATTGAACTTTATAATGTTATGTGCGATCTCCTAGGCTTGAAGCCAGCT
CCCAATAATGGAACACATGGAAGTTTGAATCACCTGCTACGCACAAATACCTTTAGGCCAACCCT
ACCAGAGGAAGTCAGCAGACCCAATTACCCAGGGATTATGTACCTCAGTCTGATTTTGACCTGG
GCTGCACCTGTGATGATAAGGTAGAGCCAAAGAACAAATTGGAAGAACTAAATAAACGCCTTCAT
ACCAAAGGACTCTACAGAAGAGAGACATCTCCTGTATGGACGACCTGCAGTGCTTATCGGACTAG
CTATGATATCTTATACCATAGGGACTTTGAAAGTGGTTACAGTGAAATATTCTTAATGCCTCTCT
GGACTTCTTATACCATTTCTAAGCAGGCTGAGGTCTCTAGCATCCCAGAGCACCTGACCAACTGT
GTTCGCCCTGATGTCCGTGTATCTCCTGGATTCAGTCAGAACTGTTTAGCCTATAAAAATGATAA
ACAGATGTCCTATGGATTCCTTTTTCCICCCTATCTGAGCTCTTCCCCAGAAGCGAAATATGATG
CATTCCTTGTAACCAACATGGTTCCAATGTACCCTGCCTTCAAACGTGTTTGGACTTATTTCCAA
AGGGTCTTGGTGAAGAAATATGCGTCAGAAAGGAATGGGGTCAACGTAATAAGTGGACCGATCTT
TGACTACAATTACGATGGCTTACGTGACATTGAGGATGAAATTAAACAGTATGTGGAAGGCAGCT
CTATTCCTGTCCCTACCCACTACTACAGCATCATCACCAGCTGCGTGGACTTCACTCAGCCTGCA
GACAAGTGTGATGGTCCTCTCTCTGTGTCTTCTTTCATCCTTCCTCACCGACCTGACAATGATGA
GAGCTGTAATAGTTCCGAGGATGAGTCGAAGTGGGTAGAGGAACTCATGAAGATGCACACAGCTC
GGGTGAGGGACATCGAGCATCTCACCGGTCTGGATTTCTACCGGAAGACTAGCCGTAGCTATTCG
GAAATTCTGACCCTCAAGACATACCTGCATACATATGAGAGCGAGATTTAACTTCCTGGGCCTGG
GCAGTGTAGTCTTAGCAACTGGTGTATATTTTTATATGGTGTTTGTATTTATTAATTTGAAACCA
GGACATAAACAAACAAAGAAACAAATGAAAAAAAAAAAAAAA

【図８Ｆ】

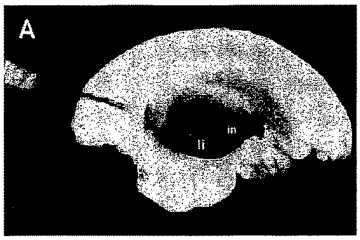
図 8F. マウスの 細胞外ヌクレオチド ピロホスファターゼ / ホスホジエステラーゼ 2 のアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 AAH03264.1、 配列識別番号 26)

MARQGCFGSYQVISLFTFAIGVNLCLGFTASRIKRAEWDEGPPTVLSDSPWTNTSGSCKGRCFEL
QEVGPPDCRCDNLCKSYSSCCHDFDELCLKTARGWECTKDRCGSVRNEENACHCSEDCLSRGDCC
TNYQVVCKGESHWVDDDCEEIRVPECPAGFVRPPLIIFSVDGFRASYMKKGSKVMPNIEKLRSCG
THAPYMRPVYPTKTFPNLYTLATGLYPESHGIVGNSMYDPVFDATFHLRGREKFNHRWWGGQPLW
ITATKQGVRAGTFFWSVSIPHERRILTILQWLSLPDNERPSVYAFYSEQPDFSGHKYGPFGPEMT
NPLREIDKTVGQLMDGLKQLKLHRCVNVIFVGDHGMEDVTCDRTEFLSNYLTNVDDITLVPGTLG
RIRPKIFNNLKYDPKAIIANLTCKKPDQHFKPYMKQHLPKRLHYANNRRIEDLHLLVERRWHVAR
KPLDVYKKPSGKCFFQGDHGFDNKVNSMQTVFVGYGPTFKYRTKVPFFENIELYNVMCDLLGLKP
APNNGTHGSLNHLLRTNTFRPTLPEEVSRPNYPGIMYLQSDFDLGCTCDDKVEPKNKLEELNKRL
HTKGSTEERHLLYGRPAVLYRTSYDILYHTDFESGYSEIFLMPLWTSYTISKQAEVSSIPEHLTN
CVRPDVRVSPGFSQNCLAYKNDKQMSYGFLFPPYLSSSPEAKYDAFLVTNMVPMYPAFKRVWTYF
QRVLVKKYASERNGVNVISGPIFDYNYDGLRDIEDEIKQYVEGSSIPVFTHYYSIITSCLDFTQP
ADKCDGPLSVSSFILPHRPDNDESCNSSEDESKWVEELMKMHTARVRDIEHLTGLDFYRKTSRSY
SEILTLKTYLHTYESEI

【図９Ａ】

図 9. WE474 の発現

WE474



【図１０Ａ】

図 10: WE474 配列

図 10A: ニワトリのコレクチン サブファミリーメンバー 10/ コレクチン肝臓 -1/ コレクチン 43 のコレクチン様タンパク質をコードする核酸配列 (配列識別番号 27)

CCACGCGTCCGGCTCTCAATCTTTGCACTGCTTCAGTTAGCAGAGCATTTATTTTTGATTCAGCT
GCATTTGTTAAGACTGTAACAGGAAAGGCATTTCCTGAGAAGCTGCAAGGATGAGCAGAAAGAA
AGAACAACAGCTAAGGAAATATGGGACCCTAGTAGTGCTTTTCATCTTCCAAGTTCAGATTTTTG
GTTTTGATGTTGACAATCGACCTACAACAGATGTCTGCTCGACACACACTATTTTACCTGGACCA
AAAGGGGATGATGGTGAAAAAGGAGATAGAGGAGAAGTGGGCAAACAAGGAAAAGTTGGACCAAA
AGGACCTAAAGGAAACAAAGGAACTGTGGGGGATGTCGGTGACCAGGGAATGCTTGGGAAAATCG
GTCCGATTGGAGGAAAAGGTGACAAAGGAGCCAAAGGCATATCAGGGGTATCTGGAAAAAAGGA
AAAGCAGGCACAGTCTGTGACTGTGGAANGTCCGCANAGTTGTTGACAACTGAATATCAATGTT
GCTCGGCTTAACACATNCATCAAGTTTGTAAAAGAATGGTTTTTGCNGGCCTTNAGGGGGACCGG
TGGAAAAATTCTTCCTTTTTTGGC

【図１０Ｂ】

図 10B: ニワトリ WE474 (配列識別番号 28) のタンパク質配列 (一文字コード)

MSRKKEQQLRKYGTLVVLFIFQVQIFGFDVDNRPTTDVCSTHTILPGPKGDDGEKGDRGEVGKQG
KVGPKGPKGNKGTVGDVGDQGMLGKIGPIGGKGDKGAKGISGVSGKKGKAGTVCDCG

【図１０Ｃ】

図 10C: ホモサピエンスのコレクチン サブファミリーメンバー 10 (C 型レクチン) (COLEC10) をコードする核酸配列 (GenBank アクセッション番号 NM_006438.2; 配列識別番号 29)

AAGCAGGAGGTTTTATTTAAAATAAAGCTGTTTATTTGGCATTTCTGGGAGACCCTTTTCTGAGG
AACCACAGCAATGAATGGCTTTGCATCCTTGCTTCGAAGAAACCAATTTATCCTCCTGGTACTAT
TTCTTTTGCAAATTCAGAGTCTGGGTCTGGATATTGATAGCCGTCCTACCGCTGAAGTCTGTGCC
ACACACACAATTTCACCAGGACCCAAAGGAGATGATGGTGAAAAAGGAGATCCAGGAGAAGAGGG
AAAGCATGGCAAAGTGGGACGCATGGGGCCGAAAGGAATTAAAGGAGAACTGGGTGATATGGGAG
ATCGGGGCAATATTGGCAAGACTGGGCCCATTGGGAGAGAAGGGTGACAAAGGGGAAAAAGGTTTG
CTTGGAATACCTGGAGAAAAAGGCAAAGCAGGTACTGTCTGTGATTGTGGAAGATACCGGAAATT
TGTTGGACAACTGGATATTAGTATTGCCCGGCTCAAGACATCTATGAAGTTTGTCAAGAATGTGA
TAGCAGGGATTAGGGAAACTGAAGAGAAATTCTACTACATCGTGCAGGAAGAGAAGAACTACAGG
GAATCCCTAACCCACTGCAGGATTCGGGGTGGAATGCTAGCCATGCCCAAGGATGAAGCTGCCAA
CACACTCATCGCTGACTATGTTGCCAAGAGTGGCTTCTTTCGGGTGTTCATTGGCGTGAATGACC
TTGAAAGGGAGGGACAGTACATGTTCACAGACAACACTCCACTGCAGAACTATAGCAACTGGAAT
GAGGGGGAACCCAGCGACCCCTATGGTCATGAGGACTGTGTGGGAGATGCTGAGCTCTGGCAGATG
GAATGACACAGAGTGCCATCTTACCATGTACTTTGTCTGTGAGTTCATCAAGAAGAAAAAGTAAC
TTCCCTCATCCTACGTATTTGCTATTTTCCTGTGACCGTCATTACAGTTATTGTTATCCATCCTT
TTTTTCCTGATTGTACTACATTTGATCTGAGTCAACATAGCTAGAAAATGCTAAACTGAGGTATG
GAGCCTCCATCATCATGCTCTTTTGTGATGATTTCATAATTTCCACACATGGTATGTTCATTGACC
CAATAACTCGCCAGGTTACATGGGTCTTGAGAGAGAATTTAATTACTAATTGTGCACGAGATAG
TTGGTTGTCTATATGTCAAATGAGTTGTTCTCTTGGTATTTGCTCTACCATCTCTCCCTAGAGCA
CTCTGTGTCTATCCCAGTGGATAATTTCCCAGTTTACTGGTGATGATTAGGAAGGTTGTTGATGG
TTAGGCTAACCTGCCCTGGCCCAAAGCCAGACATGTACAAGGGCTTTCTGTGAGCAATGATAAGA
TCTTTGAATCCAAGATGCCCAGATGTTTTACCAGTCACACCCTATGGCCATGGCTATACTGGAA
GTTCTCCTTGTTGGCACAGACATAGAAATGCTTTAACCCCAAGCCTTTATATGGGGGACTTCTAG
CTTTGTGTCTTGTTTCAGACCATGTGGAATGATAAATACTCTTTTTGTGCTTCTGATCTATCGAT
TTCACTAACATATACCAAGTAGGTGCTTTGAACCCCTTTTCTGTAGGCTCACACCTTAATCTCAGG
CCCCTATATAGTCACACTTTGATTTAAGAAAAATGGAGCTCTTGAAATCAAAAGAAAAAAA

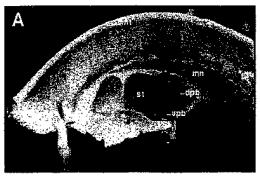
【図１０Ｄ】

図 10D: ホモサピエンスのコレクチン サブファミリーメンバー 10 (コレクチン肝臓 1: コレクチン 34 とも呼ばれる) をコードするアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 NP_006429.1; 配列識別番号 30)

MNGFASLLRRNQFILLVLFLLQIQSLGLDIDSRPTAEVCATHTISPGPKGDDGEKGDPGEEGKHG
KVGRMGPKGIKGELGDMGDRGNIGKTGPIGKKGDKGEKGLLGIPGEKGKAGTVCDCGRYRKFVGQ
LDISIARLKTSMKFVKNVIAGIRSTEEKFYYIVQEEKNYRESLTHCRIRGGMLAMPKDEAANTLI
ADYVAKSGFFRVFIGVNDLERFGQYMFTDNTPLQNYSNWNEGEPSDPYGHEDCVEMLSSGRWNDT
ECHLTMYFVCEFIKKKK

【図１１Ａ】

DP160

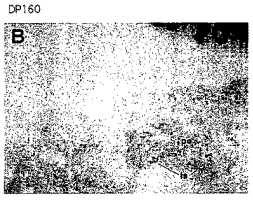


DP160 の発現

A. ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション、受精後5 日目のニワトリ胚。
DP160 は、神経管 (nt) に沿って、中腎 (mn) において、および成長する
消化管 (實線: st; 背側腸芽および腹側腸芽: dpb, vpb) において発現する。

【図１１Ｂ】

DP160



B. 成長する膵臓 (受精後 5 日目) 断面上の二重標識。
インスリンは茶色に染色し、DP160 発現は紫色に染色する。
発現は、膵島 (is) および膵臓上皮細胞において見ることができる。

【図１２Ａ】

図 12: DP160 配列

図 12A: ニワトリの DP160 様タンパク質をコードする核酸配列（配列認識番号 31）。
注：全配列は、すべて翻訳されており、ニワトリ DP160/Nocturnin の中央部分をコード化する。

TGCAGCTTGTTCCATGGGAAACAGCACCAGCCGGCTCTACAGCGCGCTCGCCAAGACGCTGAGCA
GCAGTGCCGTGTCCCAGCACCAGGACTGCCTGGAGCAGCCCAACTCGGCGCAGCTGGAGCCCATA
GACCCCAAGGACCTACTGGAGGAATGCCAGCTCGTTCTGCAGAAACGGCCACCTCGCTTCCAGAG
GAACTTCGTGGACCTGAAGAAAAACACAGCCAGTAACCACCGCCCCATCCGGGTCATGCAGTGGA
ACATNCTCGCCCAAGCTCTCGGAGAAGGCAAAGACAACTTCGTTCAGTGCCCCATGGAAGCTCTG
AAGTGGGAGGAAAGGAAGTGCCTCATCCTGGAGGAAATCCTTGCCTACAAGCCGGATATCTTGTG
CCTGCAAGAAGTCGACCACTACTTTTACACCTT

【図１２Ｂ】

図 12B: ニワトリ DP160 のアミノ酸配列（配列認識番号 32）.

AACSMGNSTSRLYSALAKTLSSSAVSQHQDCLEQPNSAQLEPIDPKDLLEECQLVLQKRPPRFQR
NFVDLKKNTASNHRPIRVMQWNXLAQALGEGKDNFVQCPMEALKWEERKCLILEEILAYKPDILC
LQEVDHYFYT

【図１２Ｃ】

図 12C: ホモサピエンス CCR4 の炭素異化代謝産物抑制 4 様（出芽酵母）(CCRN4L) の核酸配列 (GenBank アクセッション番号 XM_003343.2、配列認識番号 33).

CCGACGCAGCGGYGTTGCACCTCCCTCTCCGGCTCTGCTGCCCGGGATTTCCCCAGAACCTGGGC
CGCGCGAGAAGGAGCCTGGGAGCATCGCCCCACACTGCCCGGACAGTCGGCTCGACTCGGTGCCC
TCGGCCCCAGCCGGGCTCCGCTCCTCGGGCGCGCGAGGGGCCGTGGTGGCGGCGGCGCCCGGCAT
GTTTCATAGTCCGCGGCGGCTCTGCTCGGCCCTGCTGCAGAGGGACGCGCCCGGCCTGCGCGCCC
TGCCCGCCCCAGGGCTGCGCCGCCCGTTGTCCCCGCCGGCTGCTGTTCCCAGGCCCGCATCCCCC
CGGCTGCTGGCGGCGGCCTCGGCGGCCTCGGGCGCCGCGAGGTCGTGTTCCCGAACAGTGTGTTC
CATGGGAACCGGTACAAGCAGACTCTATAGTGCTCTCGCCAAGACGACTGAACAGCAGCGCTGCCT
CCCAGCACCCAGAGTATTTGGTGTCACCTGACCCAGAGCATCTGGAGCCCATTGATCCTAAAGAG
CTTCTTGAGGAATGCAGGGCCGTCCTGCACACCCGACCTCCCCGGTTCCAGAGGGATTTTGTGGA
TCTGAGGACAGATTGCCCTAGTACCCACCCACCTATCAGGGTTATGCAATGGAACATCCTCGCCC
AAGCTCTTGGAGAAGGCAAAGACAACTTTGTACAGTGCCCTGTTGAAGCACTCAAATGGGAAGAA
AGGAAATGTCTCATCCTGGAAGAAATCCTGGCCTACCAGCCTGATATATGTGCCTCCAAGAGGT
GGACCACTATTTTGACACCTTCCAGCCACTCCTCAGTAGACTAGGCTATCAAGGCACGTTTTTCC
CCAAACCCTGGTCACCTTGTCTAGATGTAGAACACAACAATGGACCAGATGGTTGTGCCTTATTT
TTTCTTCAAAACCGATTCAAGCTAGTCAACAGTGCCAATATTAGGCTGACAGCCATGACATTGAA
AACCAACCAGGTGGCCATTGCACAGACCCTGGAGTGCAAGGAGTCAGGCCGACAGTTCTGCATCG
CTGTTACCCATCTAAAAGCACGCACTGGCTGGGAGCGGTTTCGATCAGCTCAAGGCTGTGACCTC
CTTCAGAACCTGCAAAACATCACCCAAGGAGCCAAGATTCCCCTTATTGTGTGTGGGGACTTCAA
TGCAGAGCCAACAGAAGAGGTCTACAAACACTTTGCTTCCTCCAGCCTCAACCTGAACAGCGCCT
ACAAGCTGCTGAGTGCTGATGGGCAGTCAGAACCCCCATACACTACCTGGAAGATCCGGACCTCA
GGGGAGTGCAGGCACACCCTGGATTACATCTGGTATTCTAAACATGCTCTAAATGTAAGGTCAGC
TCTCGATCTGCTCACTGAAGAACAGATTGGACCCAACAGGTTACCTTCCTTCAATTATCCTTCAG
ACCACCTGTCTCTAGTGTGTGACTTCAGCTTTACTGAGGAATCTGATGGACTTTCATAAAATACTT
GCTTTTGTCTTTTTAATCACAGGAGTCTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTC
TCGCTCTGTTGCCTAGGCTGGAGTACAGTGGCCTGATCTCGGCTCACTGCAAGATCCGCCTCCCG
GGTTCATGGCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCAGAGCAACTGGGACAACAGGCGCCCGTCACCACGC
CCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCGTGTTAGCCAGGATGGTCTCGAT
CTCCTGACCTTG

【図１２Ｄ】

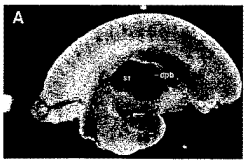
図 12D. Nocturnin (CCR4 タンパク質ホモログ）に類似するヒトのアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 XP_003343.3; 配列認識番号 34).
注：GeneScan 予想に由来するものであり、単一アミノ酸交換を除いては、公開された Nocturnin 配列と同一である。両配列共に同一遺伝子から取り出したものである。

MFKSPRRLCSALLQRDAPGLRRLPAPGLRRPLSPPAAVPRPASPRLLAAASAASGAARSCSRTVC
SMGTGTSRLYSALAKTLNSSAASQHPEYLVSPDPEHLEPIDPKELLEECRAVLHTPPPRFQRDFV
DLRTDCPSTHPPIRVMQWNILAQALGEGKDNFVQCPVEALKWEERKCLILEEILAYQPDILCLQE
VDHYFDTFQPLLSRLGYQGTFFPKPWSPCLDVEHNNGPDGCALFFLQNRFKLVNSANIRLTAMTL
KTNQVAIAQTLECKESGRQPCIAVTHLKARTGWEERFRSAQGCDLLQNLQNITQGAKIPLIVCGDF
NAEPTEEVYKHFASSSLNLNSAYKLLSADGQSEPFYTTWKIRTSGECRHTLDYIWYSKHALNVRS
ALDLLTEEQIGPNRLPSFNYPSDHLSLVCDFSFTEESDGLS

【図１３Ａ】

図 13: RA977 の発現

RA977



【図１３Ｂ】

RA977

【図１４Ａ－１】

図 14: RA977 配列

図 14A: RA977 の核酸配列（配列識別番号 35）。終止コドンおよび開始コドンは太字で示し、UTR には下線を引いた。

ACGCACGCACCTCTGCCTCTGCAGGCGGATGAGGGGCACTTTTGAAAATTATTTTCTTTCCACAC
CCAACCCTCGTCTGACATCACTTCTGCAGGAGGGAGGGCGGGAACAGCCCCGCTGCCAGAAGGTC
GCGGAGAGCTCCGCCGGCCCCCGCGCACCATTTGTCTCAAACTAAATACTCTTCAAATCAAGGAT
GTTGATTCTTCTGGCTTTCATTATTATATTTCACATAACTTCAGCAGCGCTGTTGTTCATCTCAA
CTATTGACAATGCCTGGTGGGTAGGAGATAACTTTTCTACAGATGTCTGGAGTGCATGTGCCACA
AATAATAGCACCTGCACACCTATTACTGTTCAATTCAGAGAATATCAATCAATTCAGGCTGTTCA
GGCCTGCATGGTCCTATCTACTATTTTCTGTTGTGTGGCATTTCTGGTTTTCATTCTTCAACTTT
TCCGTCTAAAGCAAGGAGAAAGATTTGTGTTAACCTCTATTATCCAGCTCCTGTCATGTCTGTGC
GTTATGATGTCAGCTTCCATTTACACAGATAGGCATGAGGAACTGCACAAGAGCATTGAATATGC
CATTGAAGTTTCTAAAGGCCAATATGGCTATTCCTTCGTCTTAGCCTGGATTGCATTCGCCTTTA
CTCTGATCAGTGGTGTTATGTACCTAGTATTAAGGAAACGTAAATAAATGTTGGCAGCTAGTTAT
TACTGTCACGGCAGTACAAAACCAAATTCCAGTAACTATTTTGTATNNNNNNNNNNNNNNGGTTT
TGTAGTAAAGGTATTGTTTCTCTAAAAATGTACTGTGTTCTTAATATGAAACAGAATACAAAACA
AAAAACAACCAACAGCAGGTTTAATGGAATGCCTGGCATTCGGTCTGAGCAAGACTGACCCAAGT
TTTCTTTTACTTATTTCACCATCATCAGTGGTGAAATGGTGTCTTTCCTTTCTTAGACATTAACA
GTTCTTGGCCTCTGTCAGATTACTATTAAAGTCTTTGTAAATTAATTTGGAAGCAATGTGCTAAG
CATACTCCTGGCCTGGATCTAGCCCTTTGGGATGGATAAATACAGGGNNNNNNNNNNNNNGGCC
AGGATCGTGATGCAAAAGCAAACAAGTATAAAAGCCCAAAGCTGCACTCAATGTTGCTGTTCTAG
CAGAGGACGAATGTTCTGCTATTTATAATGTGCAGTAAGTGTCATCAAGCTTTTATTAAAACCAC
TTGCTCTGCAAAAGTAAACAACTCCTTTTTGTACTCCAGCAACTGATTCTCTTTATCCTTCTTCA
CGTTTAATTTAAGCATACAGAGCCTTTGGCAGGAAAAGTTACAATCAAATTCGAAATTCAGTGCA
CAACTTGAGACAGGAGTAGTCTGAGCAGAAAGAGGTACTCCACTCAAGTCCTGCAGCCCTTTATT
TTTGCATTGTGCAGTACCAAATTTAACACTTTTTTTCAGCCAAACTCAGTATGTTTATTACATT
GGGCTCTGGCTAGATATATCATGTTGGCTAATATATGATTTAGAAAAGGCTCTTCTTTTTGTTT
TTCCTGTGTCTGCTCACTAGGAAATTGGCCTTTACAAAATTCATTCTAAGTTCCTATGTGGATTT
GACTTGAATAAGAATTCCTACTAAAGAAATCAGAGTGTAACTATTATGCATAGGAGTTCCAGGAT
AGTTTTAAGAATTTTGGTGATTCTTTGTTTGAATAATTCTGTGAGAGAATTACTGTAATACCA
GATTTAACTGCTCAGCAATATAATACTGGCTTTGGCTGGTGGTGATTTCAGGGTTGGAGACCAG
TGTGGGGAATGAATTAAGTGGCTTTTTCTGGTTAGTCACACTTCTGATGTTAAAATGTAGATTTG
ACTTTGTAAAAGCATTAACCCTGTATTCATTTCATGATACTCACTGCAGCTGACCCAATATATAG
GCAATAAAAATAAATGAATTTTAAATGAGATTTTACACTTAATGTAGAACAAAATTCCTATTACA
AAATAATGTAGCTCTACTAATGTTGATAACTTACCCTATTACACAGCAGCTGATAGTCTGACCCA
TTGCTGCAGGTAGTTCATCCTTGAGTTCTCACGGAACTGTATAGGAATTGTGTCGGACATGAGTA
ATGGGTCATGCTGTTCCATCTCCATTCCCTGAACATCCTAAAATGCACTAACGAGTAATACTTCT
ATTAGGGAGCAAAGAAAGCACAACAGGACTGGCAAGAAGTTAATTAGACAACTAAGCAGAACAGC
AAATTAATAGTAAAAATAACAGCAGTTAAAAAAAAACCCTCAATAAATCAGTCTGAGCGAAATGCA
TTCTCACCTTCCCAGTCTTGCATGATGCTAATCTTCTGTTAGTCTTTTTCTCTTAGTGGGAACA
CTCTGAATTTCAGGCATTACTACCCTACTTTTAAAAAAGTGTTTCTGCTGTTTGCTGAATACAT

【図１４Ａ－２】

TTCAGATTCAAAACGTGAATTTTGCTAGCAAGCAGGATTTGTTTTAAATAAACAGATGTAGGTTT
AAGGCTGAAAGTAGATAGTCTGTAAGTTGGGTGTTTGGCTAGTCTTATTCAAACATGAAATATTA
AGGGTGAAATTCTAAAACAAATGTGCATTGAAGCTATTTTATATCTAGAAGATAATCCTATAACA
CTGTAAATTAAGCTGAAATGCCACTGACTTGAAGAGATGCTTCTTCAGTTTCTTGCCTTAATAAT
GCTTAGGTCATTTATAGAGCAAATATTTAAGATAAAGATGTATATATACATGAACTCAGCTTACT
TCTACAGTAAAAGCTCTGTCACTTTAGTTAGAAGTGAAAAGCACACACAGCAGCATATACGTGGT
GCCACACAGAGAACATACGTCAATATTCGAAGTACCAAGAAAATAAATGCCAAAAAGTTTGGACA
AGAGTTTAACAGGACAAACATATTTTAGAATATTCTTTTTATCTGATATGCTTTTAAAATATAC
CATTTTCTATGCTCTATATATTCTGAAATTGTACATGAAAATAAAGTTAAAATGAATTCTTGTAT
TGTAAAAAAAAAAAAAAAAA

【図１４Ｂ】

図 14B: RA977 のアミノ酸配列（配列識別番号 36）.

MLILLAFIIIFHITSAALLFISTIDNAWWVGDNFSTDVWSACATNNSTCTPITVQFRYQSIQAV
QACMVLSTIFCCVAFLVFILQLFRLKQGERFVLTSIIQLLSCLCVMIAASIYTDRHEELHKSIEY
AIEVSKGQYGYSFVLAWIAFAFTLISGVMYLVLRKRK

【図１４Ｃ】

図 14C. ホモサピエンスの上皮膜タンパク質 2 (EMP2), mRNA の核酸配列 (GENBANK アクセッション番号 XM_030218.1; 配列識別番号 37)

CAGCACATCCCGCTCTGGGCTTTAAACGTGACCCCTCGCCTCGACTCGCCCTGCCCTGTGAAAAT
GTTGGTGCTTCTTGCTTTCATCATCGCCTTCCACATCACCTCTGCAGCCTTGCTGTTCATTGCCA
CCGTCGACAATGCCTGGTGGGTAGGAGATGAGTTTTTTGCAGATGTCTGGAGAATATGTACCAAC
AACACGAATTGCACAGTCATCAATGACAGCTTTCAAGAGTACTCCACGCTGCAGGCGGTCCAGGC
CACCATGATCCTCTCCACCATTCTCTGCTGCATCGGCCTTCTTCATCTTCGTGCTCCAGCTCTTCG
GCCTGAAGCAGGGAGAGAGGTTTGTCCTAACCTCCATCATCCAGCTAATGTCATGTCTGTGTGTC
ATGATTGCGGCCTCCATTTATACAGACAGGCGTGAAGACATTCACGACAAAAACGCGAAATTCTA
TCCCGTGACCAGAGAAGGCAGCTACGGCTACTCCTACATCCTGGCGTGGGTGGCCTTCGCCTGCA
CCTTCATCAGCGGCATGATGTACCTGATACTGAGGAAGCGCAAATAGAGTTCCGGAGCTGGGTTG
CTTCTGCTGCAGTACAGAATCCACATTCAGATAACCATTTTGTATATAATCATTATTTTTTGAGG
TTTTTCTAGCAAACGTATTGTTTCCTTTAAAAGCCCAAAA

【図１４Ｄ】

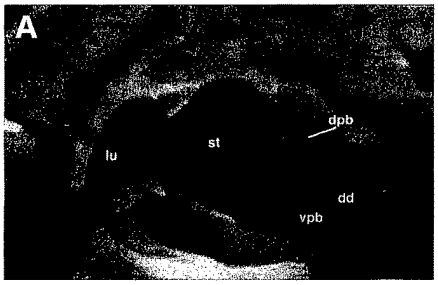
図 14D. EMP2, ヒト上皮膜タンパク質 2 (EMP-2) (XMP タンパク質）のアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 P54851; 配列識別番号 38)

MLVLLAFIIAFHITSAALLFIATVDNAWWVGDEFFADVWRICTNNTNCTVINDSFQEYSTLQAVQ
ATMILSTILCCIAFFIFVLQLFRLKQGERFVLTSIIQLMSCLCVMIAASIYTDRREDIHDKNAKF
YPVTREGSGYGYSYILAWVAFACTFISGMMYLILRKRK

【図１５Ａ】

図 15

RA770



RA770/Neurturin (NTN) の発現

A. 受精後 5 日目のニワトリ胚を用いたホールマウント in-situ ハイブリダイゼーション。発現は十二指腸 (dd) および腹側膵芽 (vpd) に沿って、および胃腸領域 (st)、肺臓 (lu) および背側膵芽 (dpb) において観察される。

【図１６Ａ】

図 16: RA770 配列

図 16A: ニワトリの RA770 様 タンパク質をコードする核酸配列 (配列識別番号 39)。

GGTCGACCCACGCGTCCGGGTGAGCGTCAGCGAGTTGGGCCTGGGCTACGAGTCGGACGAGACCG
TGTTGTTCCGCTACTGCAGCGGCACCTGCGACGCCGCCGTCAGGAACTACGACCTCTCGCTGAAG
AGCGTGCGCAGCCGGAAGAAGATCAGGAAGGAGAAGGTGCCGCGCGCGGCCCTGCTGCAGGCCGCT
GGCCTACGATGATGACGTCTCCTTCTTGGATGCCTACAACCGCTACTACACCGTCAATGAGCTGT
CGGCCAAAGAGTGTGGCTGTGTGTGAAGGGCCGGGTTGGGGGGTGGCTCAATGGGGCCGAAGCCC
GTGGTGGGGATGGGGATGGACCCCGCACCGCTGCCCGCCCCATGGACCTCCCGTGTCCAGTTGGA
GGAGGAGAGACGACCCATGGACCTACCATGTCCATTGGGAAGAGGAAAGATGCCCCATGGACCCT
CCGTGTCCATTGGGAGGAGGAGAAATGCCCCACAGACCCCCCATGTCCATTGGGAAGAGGAGAGA
TGCCCCATGGACCCTTCGTGTCTAGTGGGAA

【図１６Ｂ】

図 16B: ニワトリ RA770 のアミノ酸配列 (配列識別番号 : 40).

VDPRVRVSVSELGLGYESDETVLFRYCSGTCDAAVRNYDLSLKSVRSRKKIRKEKVRARPCCRPL
AYDDDVSFLDAYNRYYTVNELSAKECGCV

【図１６Ｃ】

図 16C: ホモサピエンスの neurturin の核配列 (GenBank アクセッション番号 NM_004558.1: 配列識別番号 : 41).

ATGCAGCGCTGGAAGGCGGCGGCCTTGGCCTCAGTGCTCTGCAGCTCCGTGCTGTCCATCTGGAT
GTGTCGAGAGGGCCTGCTTCTCAGCCACCGCCTCGGACCTGCGCTGGTCCCCCTGCACCGCCTGC
CTCGAACCCTGGACGCCCGGATTGCCCGCCTGGCCCAGTACCGTGCACTCCTGCAGGGGGCCCCG
GATGCGATGGAGCTGCGCGAGCTGACGCCCTGGGCTGGGCGGCCCCCAGGTCCGCGCCGTCGGGC
GGGGCCCCGGCGGCGGCGCGCGCTGCGCGGTTGGGGGCGCGGCCTTGCGGGCTGCGCGAGCTGG
AGGTGCGGGTGAGCGAGCTGGGCCTGGGCTACGCGTCCGACGAGACGGTGCTGTTCCGCTACTGC
GCAGGCGCCTGCGAGGCTGCCGCCGCCGCGTCTACGACCTCGGGCTGCGACGACTGCGCCAGCGGCG
GCGCCTGCGGCGGGAGCGGGTGCGCGCGCAGCCCTGCTGCCGCCCGACGGCCTACGAGGACGAGG
TGTCCTTCCTGGACGCGCACAGCCGCTACCACACGGTGCACGAGCTGTCGGCGCGCGAGTGCGCC
TGCGTGTGA

【図１６Ｄ】

図 16D. ヒト neurturin 前駆体のアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 NP_004549.1: 配列識別番号 : 42)

MQRWKAAALASVLCSSVLSTWMCREGLLLSHRLGPALVPLHRLPRTLDARIARLAQYRALLQGAP
DAMELRELTPWAGRPPGPRRRAGPRRRAARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLFRYC
AGACEAAARVYDLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAHSRYHTVHELSARECA
CV

【図１６Ｅ】

図 16E: ハツカネズミの neurturin の核配列 (GenBank アクセッション番号 NM_008738.1: 配列識別番号 43).

GGAGGGAGAGCGCGCGGTGGTTTCGTCCGTGTGCCCCGCGCCCGGCGCTCCTCGCGTGGCCCCGC
GTCCTGAGCGCGTCCAGCCTCCCACGCGCGCCACCCCGGGGTTCACTGAGCCCGGCGAGCCCGG
GGAAGACAGAGAAAGAGAGGCCAGGGGGGGAACCCCATGGCCCGGCCCGTGTCCCGCACCCTGTG
CGGTGGCCTCCTCCGGCACGGGGTCCCCGGGTCGCCTCCGGTCCCCGCCATCCGGATGGCGCACG
CAGTGGCTGGGGCCGGGCCGGGCTCGGGTGGTCGGAGGAGTCACCACTGACCGGGTCATCTGGAG
CCCGTGGCAGGCCGAGGCCCAGGATGAGGCGCTGGAAGGCAGCGGCCCTGGTGTCGCTCATCTGC
AGCTCCCTGCTATCTGTCTGGATGTGCCAGGAGGGTCTGCTCTTGGGCCACCGCCTGGGACCCGC
GCTTGCCCCGCTACGACGCCCTCCACGCACCCTGGACGCCCGCATCGCCCGCCTGGCCCAGTATC
GCGCTCTGCTCCAGGGCGCCCCCGCACGCGGTGGAGCTTCGAGAACTTTCTCCCTGGGCTGCCGC
ATCCCGGGACCGCGCCGTCGAGCGGGTCCCCGGCGTCGGCGGGCGCGGCCGGGGGCTCGGCCTTG
TGGGCTGCGCGAGCTCGAGGTGCGCGTGAGCGAGCTGGGCCTGGGCTACACGTCGGATGAGACCG
TGCTGTTCCGCTACTGCGCAGGCGCGTGCGAGGCGGCCATCCGCATCTACGACCTGGGCCTTCGG
CGCCTGCGCCAGCGGAGGCGCGTGCGCAGAGAGCGGGCGCGGGCGCACCCGTGTTGTCGCCGCGAC
GGCCTATGAGGACGAGGTGTCCTTCCTGGACGTGCACAGCCGCTACCACACGCTGCAAGAGCTGT
CGGCGCGGGAGTGCGCGTGCGTGTGATGCTACCTCACGCCCCCGACCTGCGAAAGGGCCCTCCC
TGCCGACCCTCGCTGAGAACTGACTTCACATAAAGTGTGGGAACTCCC

【図１６Ｆ】

図 16F. マウスの neurturin 前駆体のアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 NP_032764.1; 配列識別番号 : 44)

MRRWKAAALVSLICSSLLSVWMCQEGLLLGHRLGPALAPLRRPPRTLDARIARLAQYRALLQGAP
DAVELRELSPWAARIPGPRRRAGPRRRRARPGARPCGLRELEVRVSELGLGYTSDETVLFRYCAG
ACSAAIRIYDLGLRRLRQRRRVRRERARAHPCCRPTAYEDEVSFLDVHSRYHTLQELSARECACV

【配列表】
0005754698000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ａ６１Ｐ	*3/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ

(72)発明者　コルト　ドールマン
ドイツ連邦共和国　ゲッティンゲン　アム　メンツェルベルク　８
(72)発明者　マティアス　アウステン
ドイツ連邦共和国　ゲッティンゲン　ヴァッハオールダーヴェーク　２４

合議体
審判長　田村　明照
審判官　新留　素子
審判官　大久保　元浩

(56)参考文献　国際公開第００／１８９２２（WO，Ａ１）
特表平１１－５１２９２８（ＪＰ，Ａ）
ＳＯＣＩＥＴＹ　ＦＯＲ　ＮＥＵＲＯＳＣＩＥＮＣＥ　ＡＢＳＴＲＡＣＴＳ，Ｖ２７，　Ｎ１，Ｐ３６１

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ１５／００－１５／９０
Ａ６１Ｋ３７／０２
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ
ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ／ＰＩＲ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ／ＣＡ（ＳＴＮ）